

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie  
Universitätsmedizin Rostock



Endothelialisierung und Basalmembranentwicklung auf künstlichen Gewebesubstraten sowie  
deren mechanische Charakterisierung nach Endothelzell-plus-Fibrin-Sprühapplikation und  
Laminin-1-Biofunktionalisierung

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Loni Zacher, geb. am 01.11.1989 in Braunschweig

aus Wolfenbüttel, Deutschland

Rostock, den 23.03.2019

---

**Dekan:** Prof. Dr. med. Reisinger

**Gutachter:**

Prof. Prof. Dr. med. Stefan Jockenhoevel, RWTH Aachen, Institut für Angewandte Medizintechnik

Prof. Dr. med. Björn Spittau, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Anatomie

Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff, Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Herzchirurgie

**Jahr der Einreichung:** 2019

**Jahr der Verteidigung:** 2020

---

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Klopsch C, Ludwig M, Skorska A, **Zacher L**, Jerke M, Luderer F, Arbeiter D, Grabow N, Michael T, Gaebel R, Lux C, Mela P, Jockenhoevel S, Prall F, David R, Steinhoff G. Direct sprayed endothelialization, basement membrane and cell junction development on biological and artificial products are highly substrate-dependent and require optimized biofunctionalization. *BioNanoMaterials*. 2015;16(1):285-99. DOI:10.1515/bnm-2015-0010 (De Gruyter database; ISSN 2193-066X)

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung in das Thema .....	1
1.2 Pathophysiologischer Hintergrund .....	2
1.2.1 Anatomie und Funktion der Herzklappen .....	2
1.2.2 Histologie Endokard .....	2
1.2.3 Prothesen-relevante Pathologien der Herzklappen .....	3
1.3 Therapie der Herzklappenerkrankungen .....	5
1.3.1 Überblick Klappenersatztherapie .....	5
1.3.2 Herzklappenprothesen .....	6
1.3.4 Ergebnisse und Pathologien nach Herzklappenersatz .....	8
1.4 Die Basalmembran .....	9
1.4.1 Anatomische Grundlagen .....	9
1.4.2 Das Glykoprotein Laminin .....	11
1.5 Kardiovaskuläres Tissue Engineering .....	12
1.5.1 Einführung in die Gewebezüchtung .....	12
1.5.2 Prothesenmaterialien und Biofunktionalisierung .....	15
1.5.3 Spezifische Polymere als Prothesenmaterial .....	17
1.5.4 Zellquellen .....	18
1.6 Fragestellung dieser Arbeit .....	20
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Polymervliese .....	23
2.1.1 Herstellung der Polymervliese .....	23
2.1.2 Physikalische Charakterisierung der Polymervliese .....	25



---

2.2 Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene: Isolation und Zellkultur .....	26
2.3 Oberflächenmodifikation der Polymere.....	29
2.3.1 Endotheliale Zellularisierung.....	29
2.3.2 Lamininbeschichtung.....	31
2.4 Auswertungsmethoden .....	32
2.4.1 Oberflächenanalyse mit dem Rasterelektronenmikroskop .....	32
2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie .....	33
2.4.3 Immunhistochemie .....	35
2.4.4 Polymerasekettenreaktion .....	37
2.4.5 Spezifischer Polymerasekettenreaktionsarray für Zellverbindungen .....	41
2.5 Statistische Analyse .....	41
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1 Mechanische Eigenschaften der Grundgerüstmaterialien.....	43
3.2 Nanostruktur der Polymervliese .....	45
3.3 Fokus I: Zellularisierungsergebnisse der Polymervliese .....	47
3.3.1 Endothelialisierung nach 24 Stunden Kultivierung .....	47
3.3.2 Basalmembranentwicklung nach 24 Stunden Kultivierung .....	51
3.3.3 Mechanische Eigenschaften der Vliese nach 14 Tagen Kultivierung .....	53
3.3.4 Endothelialisierung nach 14 Tagen Kultivierung .....	54
3.3.5 Basalmembranentwicklung nach 14 Tagen Kultivierung .....	56
3.4 Fokus II: Auswirkung der Lamininbiofunktionalisierung von Polyamid-6 .....	62
3.4.1 Mechanische Eigenschaften nach Biofunktionalisierung und 14 Tagen Kultivierung.....	62
3.4.2 Endothelialisierung nach Biofunktionalisierung und 14 Tagen Kultivierung .....	64
3.4.3 Basalmembranentwicklung nach Biofunktionalisierung und 14 Tagen Kultivierung.....	67
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>71</b>
4.1. Diskussion der Ergebnisse .....	71
4.1.1 Diskussion der mechanischen Eigenschaften.....	71
4.1.2 Diskussion der Nanofaserbetrachtung .....	74

---

4.1.3 Diskussion der Zellvitalität und Endothelialisierung .....	74
4.1.4 Diskussion der Basalmembranentwicklung.....	75
4.1.5 Diskussion der Auswirkung von Laminin auf die Endothel- und Basalmembranbildung.....	77
4.1.6 Diskussion der Auswirkung von Laminin auf spezifische Zellverbindungen .....	79
4.2 Diskussion weiterer Ergebnisse anderer Forschungsgruppen .....	81
4.2.1 Aktuell diskutierte Grundgerüste und Zellquellen .....	81
4.2.2 Aktuell diskutierte Methoden des Tissue Engineering.....	85
4.3 Grenzen der Untersuchungen und Ausblick.....	87
<b>5. Zusammenfassung und Thesen .....</b>	<b>91</b>
5.1 Zusammenfassung.....	91
5.2 Thesen .....	92
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>V</b>
7.1 Protokolle und Anleitungen .....	V
7.2 Information und Einwilligung zur Nabelschnurspende .....	XI
<b>Publikation.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>XIX</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>XX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langform / Übersetzung
AK	Aortenklappe
BM	<i>engl.</i> Basement membrane = Basalmembran
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumin = Rinderalbuminserum
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CB-	<i>engl.</i> Cord buffer = Nabelschnurpuffer
cDNA	<i>engl.</i> Copy desoxyribonucleinacid = Kopie der Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
C <sub>T</sub>	<i>engl.</i> Cycle threshold = Zyklusschwellenwert
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>engl.</i> Desoxyribonucleinacid = Desoxyribonukleinsäure
DVS	Dapi Vectashield
EBM	<i>engl.</i> endothelial basal medium = endotheliales Basismedium
EC-Fib	Endothelzell-plus-Fibrin-Hydrogel
ECM	<i>engl.</i> extracellular matrix = Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM	<i>engl.</i> endothelial growth medium = endotheliales Wachstumsmedium
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
FBS	<i>engl.</i> fetal bovine serum = Fetales Rinderserum
FKGO	Forschungslaboratorien für kardialen Gewebe- und Organersatz
GA	Gentamicin + Amphotericin-B
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HDI	Hexamethylendiisocyanat
hEGF	<i>engl.</i> human epidermal growth factor = Humaner epidermaler Wachstumsfaktor
hFGF-B	<i>engl.</i> human fibroblast growth factor = Humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HQS	Hematoxylin Quickstaining
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HUVECs	<i>engl.</i> human umbilical cord vein endothelial cells = humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
IBMT	Institut für Biomedizinische Technik
IECM	<i>engl.</i> interstitial extracellular matrix = interstitielle extrazelluläre Matrix
LD	Lamina densa
LL	Lamina lucida
L-PA-6	Polyamid-6 mit Laminin-1-Beschichtung
mRNA	<i>engl.</i> messenger ribonucleinacid = Boten-Ribonukleinsäure

MW	Mittelwert
NYHA	New York Heart Association
OD	optische Dichte
P3HB	Polyhydroxybuttersäure
P4HB	Poly-4-Hydroxybuttersäure
PA-6	Polyamid-6
PAS-Reaktion	<i>engl.</i> periodic acid Schiff reaction = Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	<i>engl.</i> phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCL	Polycaprolacton
PCR	<i>engl.</i> polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PGA	<i>engl.</i> Polyglutamic acid = Polyglycolsäure
PK	Pulmonalklappe
PLA	<i>engl.</i> polylactid acid = Polylactidsäure
PLLA	Poly-L-Lactid
pmRNA	<i>engl.</i> precursor messenger ribonucleinacid = Vorläufer-Ribonukleinsäure
(q)RT-PCR	<i>engl.</i> (quantitative) reverse transcription polymerase chain reaction = (quantitative) reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
IGF	<i>engl.</i> insulin-like-growth-factors = insulinähnliche Wachstumsfaktoren
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	<i>engl.</i> ribonucleinacid = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
SaBP	<i>engl.</i> spray-assisted bioprocessing = Sprühassistierte Bioprozessierung
STABW	Standardabweichung
Taq	Thermus aquaticus
TAVI	<i>engl.</i> transcatheter aortic valve implantation = Aortenklappenimplantation per Katheter
TBS	<i>engl.</i> tris-buffered saline = Pufferlösung
TE	<i>engl.</i> Tissue Engineering = Gewebeentwicklung
VEGF	<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor = vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor
VIC	<i>engl.</i> valvular interstitiell cells = valvuläre interstitielle Zellen

Desweiteren wurden die internationalen SI-Einheiten verwendet.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einsatz von Herzklappenprothesen 2014 .....	7
Abbildung 2: Basallamina .....	11
Abbildung 3: Prinzip des Tissue Engineering.....	14
Abbildung 4: Prinzip des Elektrosinning .....	24
Abbildung 5: Gesponnene Polymervliese .....	25
Abbildung 6: Maslanka® Spray Pen .....	31
Abbildung 7: Mechanische Eigenschaften von Materialien für valvuläres Tissue Engineering (Tag0) .	44
Abbildung 8: Nanofasern der Vliese mit dem Rasterelektronenmikroskop vor Zellularisierung (Tag0) .....	46
Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen nach Zellularisierung (Tag1) .....	48
Abbildung 10: Darstellung von Faserstruktur und Zellularisierung (Tag1).....	49
Abbildung 11: Histologie nach Zellularisierung (Tag1).....	50
Abbildung 12: qRT-PCR nach Zellularisierung (Tag1) .....	52
Abbildung 13: Mechanische Eigenschaften der Materialien nach der Zellularisierung (Tag14).....	53
Abbildung 14: Histologie nach Zellularisierung (Tag14).....	55
Abbildung 15: qRT-PCR nach Zellularisierung (Tag14) .....	57
Abbildung 16: Immunhistologie Collagen IV (Tag14).....	58
Abbildung 17: Immunhistologie Fibronectin (Tag14).....	59
Abbildung 18: Immunhistologie Integrin-β1 (Tag14) .....	60
Abbildung 19: Immunhistologie Laminin1+2 (Tag14) .....	61
Abbildung 20: Mechanische Eigenschaften der Materialien nach der Zellularisierung und Laminin-1- Biofunktionalisierung (Tag14) .....	63
Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen nach Zellularisierung und Laminin-1- Biofunktionalisierung (Tag14) .....	65
Abbildung 22: Histologie nach Zellularisierung und Laminin-1-Biofunktionalisierung von PA-6 (Tag14) .....	66
Abbildung 23: Immunhistologie nach Zellularisierung und Laminin-1-Biofunktionalisierung von PA-6 (Tag14).....	67
Abbildung 24: qRT-PCR nach Zellularisierung und Laminin-1-Biofunktionalisierung (Tag14) .....	68
Abbildung 25: PCR-Array <i>Cell Junction Pathway Finder</i> nach Laminin-1-Beschichtung und Zellularisierung (Tag14).....	70
Abbildung 26: valvuläre Prothesenbeispiele.....	83
Abbildung 27: Limitation durch delaminiertes PA-6 .....	88

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien und Geräte allgemein.....	22
Tabelle 2: Materialien und Geräte Zellisolation .....	26
Tabelle 3: Materialien und Geräte Zellularisierung.....	29
Tabelle 4: Materialien und Geräte Lamininbeschichtung .....	31
Tabelle 5: Materialien und Geräte Gefrierschnitte .....	33
Tabelle 6: Materialien und Geräte Fluoreszenzmikroskopie .....	33
Tabelle 6: Materialien und Geräte Immunhistochemie .....	35
Tabelle 7: Materialien und Geräte qRT-PCR.....	37
Tabelle 8: qRT-PCR Primer.....	38
Tabelle 9: Zelldichte der HUVECs 24 Stunden nach Zellularisierung auf PLLA, PCL und PA-6 .....	51
Tabelle 10: Zelldichte der HUVECs 14 Tage nach Zellularisierung auf PLLA, PCL und PA-6 .....	54

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung in das Thema

Wenn die körpereigenen Herzklappen ihrer Aufgabe durch einen angeborenen Fehler oder durch einen erworbenen Zustand nicht hinreichend nachkommen können und Patienten dadurch erhebliche Beeinträchtigungen erfahren, kann der Einsatz einer Herzklappenprothese erforderlich werden. In der aktuellen Herzchirurgie stehen Arzt und Patient dann vor der Wahl zwischen biologischen und mechanischen Prothesen, welche die hämodynamischen Funktionen des Herzens aufrecht erhalten sollen. Obwohl die Geschichte der Herzklappenprothesen ein großer Erfolg der modernen Medizin ist, sind diese Prothesen leider nicht frei von Einschränkungen. Es kann im Langzeitverlauf zu Degenerationen und in der Folge zu Reoperationen kommen oder es können postoperative Komplikationen wie Thrombosen, Embolien oder Blutungen auftreten [1]. Neben diesen möglichen Rückschlägen fehlt den gegenwärtigen Prothesen die Fähigkeit des Mitwachsens oder der selbständigen Reparatur. Daher wird stetig weiter an der Entwicklung einer idealen Herzklappe geforscht [2]. Das sogenannte *Tissue Engineering*<sup>1</sup> stellt eine Möglichkeit dar, durch angepasste Grundgerüste und speziell entwickelte Oberflächen die Überwindung der bisherigen Einschränkungen voranzutreiben. Das moderne TE versucht die Ansprüche der mechanischen Belastung mit optimalen zellphysiologischen Eigenschaften zu vereinbaren [3].

In dieser Arbeit wird ein Grundgerüst aus feinen Polymervliesen mit einer Oberfläche aus Endothelzellen kombiniert. Die Endothelzellen werden aus Nabelschnüren gewonnen, wodurch prinzipiell eine autologe Prothesenbesiedelung bei angeborenen Herzfehlern ermöglicht werden könnte. Das Elektrospinning-Verfahren, welches für die Herstellung unterschiedlicher Polymerfolien verwendet wird, bietet die Möglichkeit einer vielseitigen Produktion, auch für später angedachte dreidimensionale Strukturen. Eine wichtige Rolle für eine gelungene Oberflächenbesiedelung scheint die physiologische Endothelialisierung mit einer intakten Kontaktfläche zwischen Grundgerüst und Zelloberfläche zu spielen [4][5]. Daher werden in dieser Arbeit die spezifischen Zellvorgänge charakterisiert und in den Versuchen wird ein Fokus auf die Proteine der Basalmembran gelegt. Die Oberflächenmodifikation eines künstlichen Polymervlies mit dem Bindungsprotein Laminin wird untersucht. Die Arbeit soll eine Basis für ein Prothesenersatzverfahren darstellen, welches prinzipiell als intraoperatives Vorgehen mit einer vorbereiteten, adaptiven Prothese aus künstlichem Grundgerüst und vitaler Oberfläche angedacht ist. Die dafür notwendigen ersten Untersuchungen

---

<sup>1</sup>engl. Tissue Engineering= Gewebeentwicklung, im Folgenden als TE abgekürzt

und Analysen der grundlegenden Materialien und einer vitalen Endothelialisierung werden im Folgenden erläutert.

### 1.2 Pathophysiologischer Hintergrund

#### 1.2.1 Anatomie und Funktion der Herzklappen

Das menschliche Herz ist ein im Thorax liegendes muskulöses Hohlorgan bestehend aus vier Kammern, die vom Kammerseptum getrennt werden. Nach ähnlicher Funktion eingeteilt, bilden zwei Hohlräume dünnwandig die Vorhöfe (*Atrium cordis dextrum/sinistrum*) sowie zwei die dickwandigen Ventrikel (*Ventriculus cordis dexter/sinister*). Als funktionale Trennung zwischen den Vorhöfen und den Ventrikeln dienen die Mitralklappe (*Valva atrioventricularis sinistra*) in der linken und die Trikuspidalklappe (*Valva atrioventricularis dextra*) in der rechten Herzhälfte. Bestehend aus Segeln, Sehnenfäden und Papillarmuskeln bilden sie den atrioventrikulären Klappenapparat. Die Taschenklappen (*Valvulae semilunares*) bilden die Abgrenzung von den Ventrikeln zu den großen Auswurfbahnen des Herzens, der Aorta und dem Truncus pulmonalis [6][7].

Der mechanische Zyklus des Herzens lässt sich in mehrere Phasen aufteilen. Während der Diastole füllen sich die Ventrikel durch die Verlagerung der Klappenebene, in welcher alle Herzklappen eingebunden in einer bindegewebigen Platte liegen, mithilfe eines Ventilebenenmechanismus. In der Entspannungsphase der Diastole sind die Mitralklappe und die Aortenklappe zunächst geschlossen, sodass ein starker Druckabfall stattfindet, in dessen Folge sich die Mitralklappe öffnet und die Füllungsphase beginnen kann. Mit dem erneut steigenden Druck schließen sich die Klappen und der Druck gegen die Taschenklappen wird durch die isometrische Ventrikelkontraktion kontinuierlich größer. In der Austreibungsphase der Systole überschreitet der Ventrikeldruck den Druck in den großen Gefäßen, sodass sich die Taschenklappen öffnen. Nach dem Auswurf des Schlagvolumens sinkt der Ventrikeldruck und die Taschenklappen schließen sich. Es folgt eine isovolumetrische Relaxationsphase in welcher der Ventrikeldruck unter den Vorhofdruck fällt und sich die Segelklappen erneut öffnen [8][9].

#### 1.2.2 Histologie Endokard

Das Herz wird auf der gesamten inneren Oberfläche vom Endokard überzogen. Es besteht auf der Innenseite aus Endothel, gefolgt von einer schmalen Schicht aus lockerem Bindegewebe mit



Kollagenfasern und elastischen Fasern. Anschließend zeigt sich eine dickere Schicht aus faserreichem Bindegewebe mit glatten Muskelzellen sowie eine Gefäß- und Nervenreiche Schicht. Segel- und Taschenklappen differenzieren sich in der embryologischen Entwicklung aus den Endokardkissen. Native, gesunde Herzklappen zeigen eine inhomogene Struktur mit spezifischen Schichten an extrazellulärer Matrix und ermöglichen einen unidirektionalen Blutfluss ohne Regurgitation.

Die Semilunarklappen zeigen einen dreischichtigen Aufbau. Zur Kammerinnenseite, und somit enormen Scherkräften ausgesetzt, liegt die *Ventricularis* mit radial angelegten elastischen Fasern. Sie sorgt für eine minimale Oberfläche bei geöffneter Klappe und einen druckbedingten dichten Verschluss mit einer maximalen Fläche für die Adaptation. Die *Spongiosa* als zentrale Schicht mit lose arrangierten Kollagenfasern und vielen Glycosaminoglycanen bringt wenig strukturelle Kraft auf, hilft jedoch bei der Anpassung der Form im Zyklus. Zur Tascheninnenseite gewandt befindet sich die *Fibrosa* mit dicht gepackten Kollagenfasern, welche als Quelle der Klappenkraft dient und deren Steifheit Halt bietet. Diese Schichtung geht mit zunehmendem Alter verloren. Überzogen werden die Klappen von endokardialen Endothel, welches sich als einschichtig mit Basalmembran charakterisieren lässt. Ebenso findet sich ein dünnes Stratum subendotheliale aus elastischen Fasern [10][11][12].

Wichtig für die langfristige Funktionsfähigkeit der Klappen ist die extrazelluläre Matrix (ECM), gebildet von den Endothelzellen und den valvulären interstitiellen Zellen der Klappen, welche sich je nach Faktoren und Stimulanzen der Umgebung adaptieren kann [10].

### 1.2.3 Prothesen-relevante Pathologien der Herzklappen

Herzklappenfehler beeinträchtigen durch eine Störung des normalen Blutflusses die kardiale Hämodynamik. Sie werden unterteilt in Stenosen, bei welchen Blut nur mit erhöhtem Widerstand die Klappenebene passieren kann und Insuffizienzen, die durch ungenügendes Schließen der Klappen gekennzeichnet sind. Die Stenosen führen meist zu druckbedingten Hypertrophien, die Insuffizienzen zu einer vermehrten Volumenbelastung des Herzens. Auch ein kombiniertes Auftreten der beiden Pathologien ist nicht selten.

Herzklappenfehler können kongenital vorkommen und treten in diesem Falle häufig kombiniert mit weiteren Fehlbildungen des Herzens auf. Die Pathologie der erworbenen Herzklappenerkrankungen hat sich in den letzten Jahrzehnten durch die zunehmend älter werdende Bevölkerung, das seltenere Auftreten des rheumatischen Fiebers aufgrund von früherer und konsequenterer Antibiose und weitere Faktoren verändert [13]. Heute ist eine immer weiter ansteigende Anzahl von Klappenerkrankungen von degenerativer oder sklerotischer Ätiologie [14].

Die **Aortenklappenstenose** ist heutzutage in den industrialisierten Staaten nach der koronaren Herzkrankheit und der arteriellen Hypertonie die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung im höheren Alter. Die Pathogenese zeigt in circa 80% eine kalzifizierende Ursache, wobei festgestellt wurde, dass vor allem sklerotisch bedingte Ablagerungen ähnlich der Atherosklerose ursächlich sind, deren Vorstufe die weit verbreitete Aortenklappensklerose ist. Weitere Ursachen sind kongenitale Fehlbildungen oder ein durchlaufenes rheumatisches Fieber mit Endokarditis. Da sich die Prognose von Patienten mit Aortenklappenstenose nach dem Auftreten von Symptomen wie Dyspnoe, Angina pectoris oder Synkopen rasch verschlechtert, ist zu diesem Zeitpunkt der operative Klappenersatz das Mittel der Wahl und verspricht einen guten Verlauf [13][15][9][8].

Die **Mitralklappeninsuffizienz** stellt nach der Aortenklappenstenose die zweithäufigste Operationsindikation für einen Klappenersatz oder Rekonstruktion in Europa und den USA dar. Die Ursachen der Mitralklappeninsuffizienz sind vielfältig. Chronische Ursachen sind die degenerative Verkalkung der Segel oder ein Mitralklappenprolaps sowie die sekundäre Entstehung bei Herzinsuffizienz. Eine akute Mitralklappeninsuffizienz tritt bei Ischämie oder Papillarmuskelruptur als Folge eines Infarktes oder bei der infektiösen Endokarditis auf [9][13].

Minimale **Insuffizienzen der Aortenklappe** ohne Symptome lassen sich mit zunehmenden Alter echokardiografisch bei circa 10% der Bevölkerung nachweisen. Bei unauffälligem Auskultationsbefund besitzen diese Insuffizienzen keine klinische oder therapiebedürftige Bedeutung. Eine schwere Aortenklappeninsuffizienz nach rheumatischem Fieber oder Endokarditis, bei kongenitalen bikuspiden Klappen, bei chronischen Aneurysmen oder bei einer akuten Aortendissektion führt jedoch zu einer Volumenüberbelastung der linken Herzkammer durch den Reflux während der Diastole. Durch die progrediente Dilatation des Ventrikels kann es in der Spätphase zur globalen Herzinsuffizienz kommen. Bei einer schweren, symptomatischen Aortenklappeninsuffizienz sollte der operative Klappenersatz erwogen werden [9][13][15].

Bei Säuglingen finden sich Herzklappenfehler häufig mit anderen Herzerkrankungen kombiniert. Unter den **angeborenen Vitien** nehmen die Pulmonalstenose 10% und die Aortenstenose 7% ein. Ohne weitere kombinierte Fehlbildungen gehören sie zu den azyanotischen Herzfehlern. Seltener als die kongenitalen Herzklappenfehler finden sich bei Kindern ursächlich die rheumatische oder bakterielle Endokarditis sowie weitere Erkrankungen wie Fibrosen oder das Marfan-Syndrom [16]. Obwohl Reparaturen bei kongenitalen Herzklappenfehlern bevorzugt werden, ist es nicht immer möglich einen prothetischen Klappenersatz bei Kindern zu vermeiden [17].

### 1.3 Therapie der Herzklappenerkrankungen

#### 1.3.1 Überblick Klappenersatztherapie

Herzklappenerkrankungen können durch chirurgische Rekonstruktion oder prothetischen Klappenersatz effektiv behandelt werden. Die Durchführung kann am offenen Herzen oder minimalinvasiv über eine seitliche Thorakotomie sowie als jüngste Prozedur über einen Katheter als sogenannte TAVI<sup>2</sup> erfolgen. Die verwendeten Prothesen sind aktuell entweder mechanischer Art aus Metall und Kunststoffen oder biologisch aus tierischem (*Xenografts*) oder menschlichem (*Homografts*) Material.

Die Entwicklung des Herzklappenersatzes hat sich historisch betrachtet schnell vollzogen. Nach Entdeckung der Möglichkeit von Operationen am offenen Herzen mithilfe der Herzlungenmaschine folgten in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts die ersten Klappenoperationen mit künstlichen Herzklappen. Nachdem Hufnagel 1952 die Ära des künstlichen Klappenersatzes eingeleitet hatte [18], implantierten Braunwald und Morrow 1960 in Bethesda eine Klappe aus Polyurethan in Mitralposition. Starr und Edwards aus Portland erreichten mit der noch im selben Jahr implantierten Kugel-Käfig-Klappe in Mitralklappenposition ein besseres Langzeitüberleben des Patienten [19]. Harken gelang mit demselben Klappentypus die erste erfolgreiche Behandlung einer Aorteninsuffizienz [20]. Im selben Jahrzehnt folgten die ersten biologischen Ersatzklappen aus tierischem Material als Mitralklappen- und Aortenklappenersatz. Erste Operationen mit kryokonservierten Homografts in Aortenposition fanden 1962 durch Ross in London und Barrat-Boyes in Auckland statt [19][21]. Beobachtungen während dieser Jahre führten zu der Erkenntnis, dass im Krankheitsverlauf früh durchgeführte Operationen an Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose schlechte Prognosen verhindern können [14]. Seit den ersten erfolgreichen Herzklappenoperationen wurden auf dem Gebiet der Herzklappenerkrankungen große Fortschritte in operativen Techniken und in der postoperativen Pflege gemacht. Der prothetische Ersatz wurde stetig weiter von biomechanischen Ingenieuren und Herzchirurgen verbessert [22].

Von etwa 29.000 derzeit jährlich durchgeführten Klappenoperationen in Deutschland in der Erwachsenenherzchirurgie verteilen sich etwa 11800 auf den Aortenklappenersatz und circa 5600 auf die Mitralklappenprothesen. Die Tendenz der Klappenersatzoperationen, auch kombiniert mit aortokoronarem Bypass ist durch die fortschreitende Alterung der Bevölkerung steigend. Häufig werden multiple Klappenoperationen durchgeführt, am häufigsten Mitrал- und Trikuspidalklappenersatz gemeinsam oder die Aortenklappe kombiniert mit der Mitralklappe

---

<sup>2</sup> engl. transcatheter aortic valve implantation = transkatheterbasierte Aortenklappenimplantation

[15][23]. Operationsindikationen sind bei der hochgradigen Aortenstenose Symptome wie Angina pectoris, Synkopen oder eine Herzinsuffizienz der Stadien NYHA III oder IV. Bei der hochgradigen Aorteninsuffizienz werden Operationen immer vorgenommen sofern eine Symptomatik, eine linksventrikuläre Dysfunktion oder Dilatation vorliegt oder weitere Faktoren wie eine Aortenklappenendokarditis aufgetreten sind. Ein minimalinvasiver Klappenersatz durch das TAVI-Verfahren wird vorgenommen, wenn ein erhöhtes Risiko bei Standardmethoden wie beispielsweise Multimorbidität oder eine Porzellanaorta vorliegt und die Lebenserwartung des Patienten noch mehr als ein Jahr beträgt [15].

Prinzipiell sollte die Klappenrekonstruktion dem Klappenersatz gegenüber bevorzugt werden. Mit steigender Tendenz gegenüber den Vorjahren waren 2013 65,8% der Mitralklappeneingriffe Rekonstruktionen. Die transkathetergestützten Prozeduren nahmen in den letzten Jahren ebenfalls beträchtlich zu. Während 2006 nur 0,67% der isolierten Aortenklappenprothesen per Katheter durchgeführt wurden, waren es 2013 38,1%. Dieser Trend setzt sich durch Verbesserungen der Technik und die steigenden Zahlen der betreffenden Patientengruppen weiter fort [15][24][23][25].

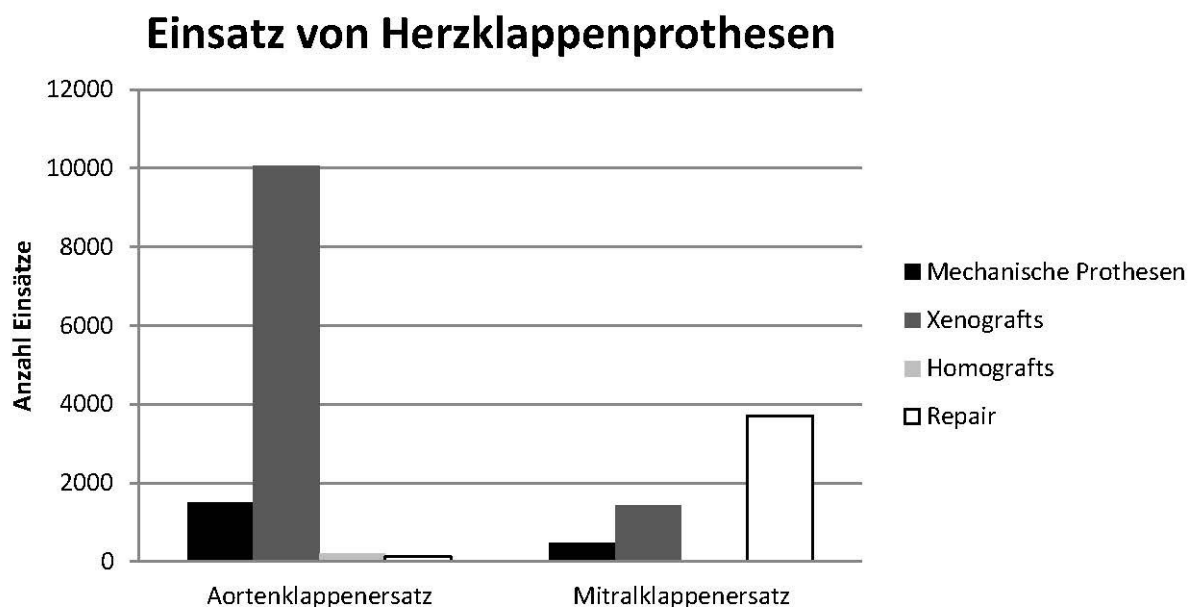
### 1.3.2 Herzklappenprothesen

Aktuell wird bei notwendigem Ersatz einer Herzklappe meist zwischen biologischen oder mechanischen Herzklappenprothesen entschieden. Die Entscheidung zum Einsatz der Prothese wird nach unterschiedlichen Kriterien individuell festgelegt. Biologische Prothesen können aus tierischem Perikard oder natürlichen Aortenklappen (meist von Rindern oder Schweinen) mit oder ohne Metallgerüst bestehen. Die Prothesen aus tierischem Material werden chemisch vorbehandelt und als xenogen bezeichnet. Dazu wird das Gewebe mit Glutaraldehyd fixiert, um die antigene Potenz zu vermindern und das kollagene Fasergerüst zu stabilisieren. Durch die Vorbehandlung werden die Zellen avital und immunologische Prozesse können weitestgehend ausgeschlossen werden. Das behandelte Material wird auf ein Metallgerüst gezogen oder ohne Rahmen verwendet. Humane Homografts werden den Leichen innerhalb von 48 Stunden nach dem Tod entnommen oder fallen bei einer Organspende an, sofern das Herz nicht transplantiert werden kann. Die Lagerung erfolgt kryokonserviert in einer Homograftbank oder für kurzfristige Aufbewahrung in Antibiotikum und Nährlösung. Hierbei bleiben die Endothelzellen vital, sodass immunologische Prozesse nicht ausgeschlossen werden können [26].

Biologische Klappenprothesen weisen durch physiologischen Verschleiß die Notwendigkeit einer Reoperation auf und werden daher bevorzugt im höheren Alter, vor allem bei Patienten über 65 Jahren, eingesetzt. Die Anfälligkeit für degenerative Veränderungen sorgt insbesondere bei jüngeren

Patienten für eine begrenzte durchschnittliche Lebensdauer moderner Xeno- und Homografts von etwa 10 bis 15 Jahren. Biologische Klappenprothesen zeigen den Vorteil, dass keine lebenslange orale Antikoagulation notwendig ist. Bei Patienten im jüngeren Alter oder bei bereits bestehender Marcumarindikation stellen die mechanischen Klappenprothesen ohne erhöhtes Reoperationsrisiko die geeignetere Alternative dar [15]. Im Bereich der mechanischen Herzklappenprothesen existieren die unterschiedlichsten Modelle unter welchen heute aufgrund der günstigen hämodynamischen Eigenschaften zumeist Doppelflügelklappen oder seltener Kippscheibenprothesen eingesetzt werden. Pyrolytischer Kohlenstoff zeigt als Material kaum Verschleiß und somit eine unbegrenzte Haltbarkeit. Aufgrund unvollständiger Endothelialisierung wirken jedoch alle mechanischen Prothesen thrombogen, sodass eine lebenslange Antikoagulation durchgeführt werden muss, um Thrombembolien zu verhindern [26][8].

Beim Aortenklappenersatz hat die Anzahl an eingesetzten Xenografts von 2004 bis 2008 in Deutschland zugenommen und sich dann auf einem Level gehalten. Durch die voranschreitende Entwicklung der biologischen Klappen hat vermutlich der Einsatz von mechanischen Prothesen im letzten Jahrzehnt kontinuierlich abgenommen [23].



**Abbildung 1: Einsatz von Herzklappenprothesen 2014**

Zahlen aus Funkat et al. [23]

### 1.3.4 Ergebnisse und Pathologien nach Herzklappenersatz

Durch die eindeutige Verbesserung der Symptomatik bei den Patienten nach Herzklappenersatz existieren nur wenige vergleichende Studien, welche die Vorteile einer Prothese gegenüber einer medikamentösen Behandlung darstellen könnten. Im Allgemeinen können das Operationsrisiko und die Langzeitriskien eines prothetischen Klappenersatzes gegenüber des Risikos eines irreversiblen Ventrikelschadens oder des plötzlichen Herztodes bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion akzeptiert werden [1].

Als schwerwiegende Probleme zeigen sich nach Einsatz von biologischen Herzklappenprothesen die Taschen- oder Segelmineralisierung sowie nicht-kalzifizierende Schädigungen und Degeneration mit rezidivierenden Beschwerden und notwendiger Reoperation. Die Kalzifizierung entsteht vor allem durch die chemische Fixierung mit Glutaraldehyd, bei welcher residuale Zellen devitalisiert werden. Sowohl bei biologischen als auch bei mechanischen Klappenprothesen tritt die infektiöse Endokarditis durch bakterielle Mikrofilme der implantierten Prothesen als seltene, aber sehr gefährliche Komplikation auf [10][2].

Nach mechanischem Klappenersatz zeigen sich aufgrund der Oberflächen Probleme wie Thrombembolien und antikoagulationsbedingte hämorrhagische Ereignisse, wenn auch häufig nur in geringem Ausmaß oder vorübergehend. Das Risiko einer folgeschweren Embolie oder Blutung überwiegt jedoch nicht die Probleme der Degeneration von biologischem Klappenersatz mit nachfolgenden Reoperationen bei Patienten unter 70 Jahren. In einer Langzeitstudie zum mechanischen Aortenklappenersatz zeigte sich die Inzidenz für thrombembolische und hämorrhagische Ereignisse vor allem von vorherigen Blutungs- oder Thrombembolieereignissen und weiteren Faktoren abhängig [1][22]. In einer retrospektiven Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Patienten zwischen 55 und 60 Jahren mit einer uneingeschränkten Lebenserwartung von einer mechanischen Prothese mehr profitieren, da sich die prothesenbedingte Morbidität bei dem Einsatz von biologischen Prothesen in dieser Altersklasse größer darstellte [27].

Beim Vergleich von derzeit verfügbaren Herzklappenprothesen zeigen sich sowohl beim biologischen als auch beim mechanischen Ersatz spezifische Vor- und Nachteile. Homografts bieten viele Vorteile im Bereich der Mechanik, stehen jedoch nur begrenzt zur Verfügung. Eine ideale, bisher noch nicht entwickelte Prothese sollte dementsprechend die Lebensdauer einer mechanischen Prothese mit einer nicht-thrombogenen Oberfläche verbinden, wenig antigenes Potenzial zeigen, eine gute Verfügbarkeit sowie ein Mitwachspotenzial aufweisen.

### 1.4 Die Basalmembran

#### 1.4.1 Anatomische Grundlagen

Im menschlichen Körper werden Oberflächen von Geweben durch Epithelzellen bedeckt, welche die Besonderheit einer polarisierten Ausrichtung besitzen. Diese ist von entscheidender Bedeutung, da sich auf der Unterseite der Epithelzellen die Basalmembran als dünne, widerstandsfähige Schicht extrazellulärer Matrix ausbildet. Die Basalmembran, auch Basallamina genannt, ist zwischen 50 und 150nm dünn, wird vom Epithel gebildet und verbindet die Epithelzellen mit dem subepitheliale Bindegewebsstroma. Bestandteile der Basalmembran sind verschiedene Proteine wie Kollagen Typ IV, das Glykoprotein Laminin, Nidogen<sup>3</sup>, das Proteoglykan Perlecan und weitere [28][12]. In Arterien und Venen wird die Oberflächenschicht Endothel genannt und es können ebenfalls die Proteine Kollagen Typ IV, Laminin, HSPG<sup>4</sup>, Entaktin sowie Fibronectin nachgewiesen werden. Die historisch eindeutige Entdeckung der Basallamina erfolgte erst durch das Elektronenmikroskop. Im Lichtmikroskop wird heute die Immunhistochemie für Analysen der Zwischenschicht bevorzugt [29][12].

Die Basalmembran ist ständigen dynamischen Umwandlungsprozessen durch Enzyme unterworfen, sodass sich eine große Variabilität zeigen kann. Die extrazelluläre Matrix und die Zellen stehen in gegenseitiger Wechselwirkung zueinander. Es werden Informationen von den Zellen aus der Umgebung durch Signale aufgenommen und Anpassungen der extrazellulären Matrix auf zellulärer Ebene vorgenommen [26][29]. Die Basalmembran bietet unzählige Funktionen, die je nach Gewebe und Lokalisation angepasst werden. Zu den wichtigsten zählen dabei die mechanische Stabilisierung von Strukturen und die Verankerung der Zellen, welche wiederum die Polarisation der Zellen und den Differenzierungszustand beeinflusst. Die Kompartimentierung des Gewebes durch die Basalmembran hilft bei der Kontrolle des Stoffaustausches im Sinne eines Filters. Zellbewegungen und Proliferation sowie der Austausch zwischen Zellen durch Enzyme und Rezeptoren gehören ebenso zu den Leistungen der Basalmembran. Auf diese Weise kommt der Basalmembran eine wichtige funktionelle Bedeutung für die Homöostase der Körperfunktionen zu [29].

Die sehr zarten Strukturen der Basallamina bestehen aus diversen Komponenten und sind gewebsspezifisch unterschiedlich auffindbar. Der wesentlichste Bestandteil der Membran ist das Kollagen Typ IV. Kollagene sind Faserproteine, an welche Adhäsionsproteine binden können oder welche direkt mit den Integrinen der Zellmembran interagieren. Kollagen Typ IV besteht im Körper ubiquitär und dient der mechanischen Stützfunktion, wobei es Bereiche hoher Stabilität sowie

---

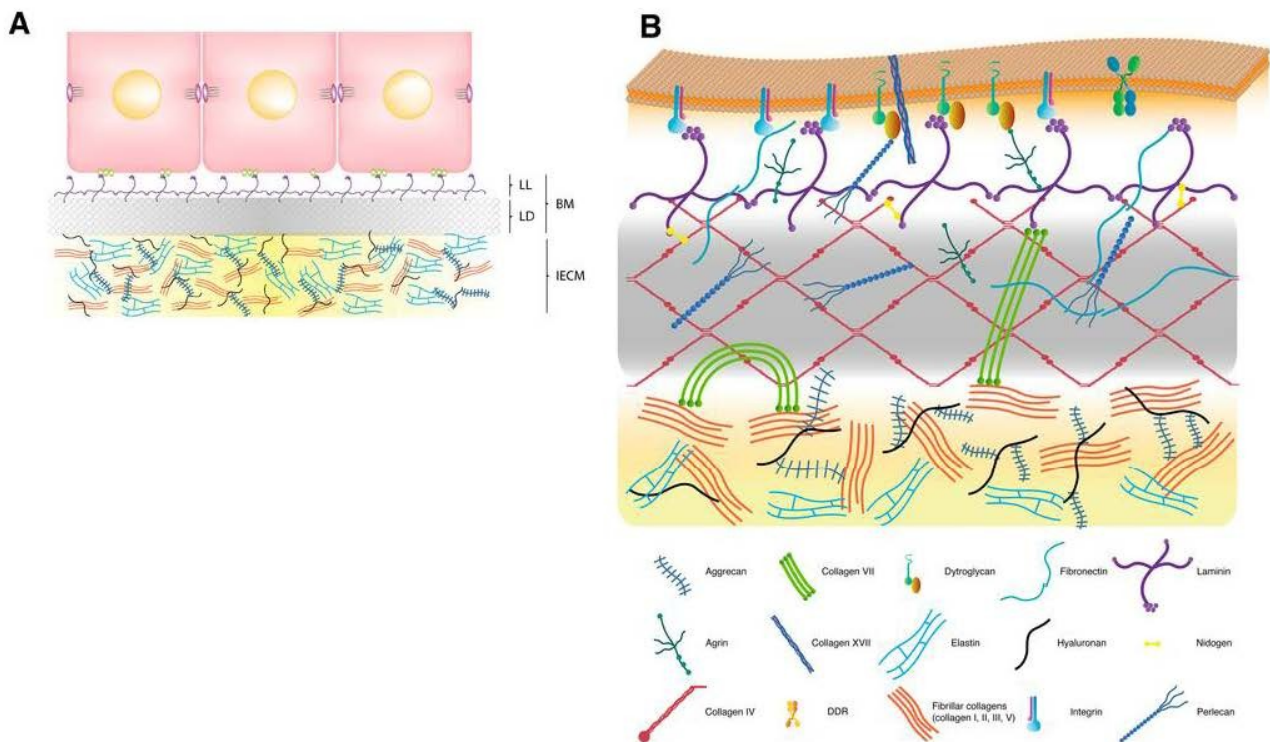
<sup>3</sup> wird auch als Entaktin bezeichnet

<sup>4</sup> Heparansulfatproteoglykan

Strukturen von erhöhter Flexibilität bilden kann, da durch Zusammenlagerung verschiedener Moleküle ein Netzwerk entsteht. Die Integrine sind Bestandteile der Zellmembran und können die Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Laminin, Fibronectin, Vitronectin und den von Willebrand Faktor binden. Sie agieren somit als transmembran liegende Rezeptoren für die Proteine der extrazellulären Matrix. Heparansulfatproteoglykan findet sich vor allem endothelial und dient der Permeabilitätskontrolle sowie als Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren. Entaktin ist ein kleines Molekül, welches für die Zell-Matrix-Interaktion und die Verknüpfung zwischen Laminin und Kollagen Typ IV von Bedeutung ist. Fibronectin ist vor allem in Gefäßwänden sowie in endothelialen Basalmembranen von größeren Gefäßen zu finden und kommt sowohl in der extrazellulären Matrix als auch in der Basalmembran vor [29]. Fibronectin kann durch Anpassungen der mRNA in verschiedenen Formen vorliegen und besitzt daher vielfältige Eigenschaften. Die zellspezifische Zusammensetzung der Basalmembran wird auf diese Weise beeinflusst. Fibronectin bindet ebenfalls an Integrine, aber auch an Kollagen, Fibrin und Heparin [30].

Gebildet aus den Proteinen finden sich zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix verschiedene Kontaktverbindungen. Dazu zählen die Adhäsionsverbindungen, Tight Junctions, Gap Junctions, Desmosomen und Hemidesmosomen, welche jeweils eine eigene Rolle bei der Kommunikation, Adhäsion und mechanischen Eigenschaften spielen. Sie dienen der Interaktion zwischen den Zellen oder zur Umgebung und sind in jeder Zelle unterschiedlich ausgeprägt. Die Analyse der Expression der einzelnen Verbindungen dient der Bestimmung der Prioritäten im Zellprozess [28].





**Abbildung 2: Basallamina**

Abbildung aus Barber et al. [31]

**A:** Epithelzelle mit Basalmembran und interstitiellem Gewebe; **B:** Ausschnitt aus A: Plasmamembran mit Basalmembran und ECM; LL= Lamina lucida (rara), LD= Lamina densa, BM= Basalmembran, IECM= Interstitielle extrazelluläre Matrix;

### 1.4.2 Das Glykoprotein Laminin

Das trimere Glykoprotein Laminin zeigt eine ausgedehnte Verteilung in den humanen Basalmembranen ähnlich dem Kollagen Typ IV. Es gehört einer großen Proteinfamilie an, innerhalb derer sich die Laminine durch verschiedene spezifische Ketten unterscheiden [29]. Es bindet als komplexes extrazelluläres Adhäsionsprotein vor allem an Epithel- und Endothelzellen und stellt einen wichtigen Baustein der Basalmembran dar. Jede Isoform besteht aus 3 Polypeptidketten ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Ketten), welche über eine dreifach alpha-helical gedrehte Domäne verbunden sind. Aktuell sind fünf  $\alpha$ -, vier  $\beta$ - und fünf  $\gamma$ -Ketten bekannt, welche zu 15 Isoformen kombiniert werden können. Über die  $\alpha$ -Ketten können verschiedene Funktionen der extrazellulären Matrix in unterschiedlichen Geweben zustande kommen. In vaskulären Endothelien sind vor allem die Laminine 8 und 10 bekannt, deren

Ausprägung wiederum stark von Gefäßtyp, Zytokinen und Wachstumsfaktoren abhängig ist [32]. Die 1979 erstmals von Timpl et al. aus der extrazellulären Matrix von Engelbreth-Holm-Swarm-Tumorzellen isolierte Isoform Laminin-1 wird als „klassisches Laminin“ oder EHS-Laminin bezeichnet und ist wichtig für die Organisation der Basalmembran sowie die am besten charakterisierte Form [33][29]. Es bindet an viele Integrinformen und wird durch seine gute Verfügbarkeit und die bekannten Eigenschaften häufig bei in-vitro Experimenten verwendet [26][32].

Laminin nimmt eine ähnlich verknüpfende Funktion wie das Fibronektin der Bindegewebe ein und zeigt viele Bindungsstellen für verschiedene Integrine der Plasmamembran von Epithelzellen. In der embryologischen Entwicklung, bei der Gewebshomöostase und beim Zellumbau sind diese Verbindungen von besonderer Wichtigkeit. Die Polarisierung und Differenzierung der Zellen wird durch den Kontakt zwischen einer Zellbindungsregion am Laminin und dem spezifischen Lamininrezeptor der Zelloberfläche beeinflusst. Ebenso finden sich am Laminin Bindungsstellen für Heparin und Kollagen Typ IV und zum Entaktin [34][29].

Untersuchungen an embryonalen Stammzellen zeigten, dass Laminin eine wichtige Rolle in der Induktion, Entwicklung und Differenzierung der Basalmembran einnimmt. Vor allem Laminine mit  $\alpha$ -1 und  $\alpha$ -2-Ketten in der heterotrimeren Form sind von entscheidender Bedeutung für die Regulation sobald sie polymerisieren und mit  $\beta$ -1-Integrin interagieren [35]. Desweiteren wurde festgestellt, dass Endothelzellen gefäßähnliche Strukturen ausbilden, wenn sie in Laminin-1-reichem Gel wachsen. Sobald Laminin als Faktor bereit steht, können eine der Basalmembran ähnliche Matrix und Kapillarstrukturen im Sinne einer Angiogenese ausgebildet werden. Das Glykoprotein beeinflusst demnach vielfältige Zellfunktionen wie Adhäsion, Wachstum, morphologische Differenzierung und Migration, was es zu einem interessanten Protein für in-vitro Biofunktionalisierung von Oberflächen macht [36].

## **1.5 Kardiovaskuläres Tissue Engineering**

### **1.5.1 Einführung in die Gewebezüchtung**

Solange die Geschichte der Medizin zurück verfolgt werden kann, gilt die Verbesserung des menschlichen Körpers durch Technik oder die Reparatur von defekten Organen als Idealvorstellung und Herausforderung. Die regenerative Medizin hat schon immer eine Faszination auf Mediziner ausgeübt und Interesse in der Bevölkerung geweckt. Eine bisher noch utopische Vorstellung ist das vollständige Nachwachsen lebenswichtiger Organe. Das TE stellt einen interdisziplinären

Forschungsbereich aus Natur- und Ingenieurwissenschaften dar, welcher an der Entwicklung von künstlichem Gewebe zur Unterstützung oder Substitution von erkrankten Organen arbeitet sowie an der Produktion von biologisch aktiven Implantaten feilt [26]. Der Begriff TE wurde 1978 offiziell für das fächerübergreifende Verfahren entworfen [37]. Das spezielle Konzept des TE von Herzklappen wurde von einer Bostoner Gruppe um Mayer, Vacanti und Shinoka 1994 mit dem Ersatz eines einzelnen Segels entwickelt und zeigt seitdem rasant fortschreitende Möglichkeiten in der Entwicklung von Prothesen [38][39]. Derzeit steht das kardiovaskuläre TE für einen vielversprechenden Forschungsbereich, in welchen viel Hoffnung und Arbeit investiert wird. Doch nicht nur für die Therapie erkrankter Gewebe ist das TE von Nutzen, auch die Verwendung von Tierversuchen könnte reduziert werden, wenn entwickelte humane Gewebe für in-vitro Tests im Labor bereit stehen würden [26].

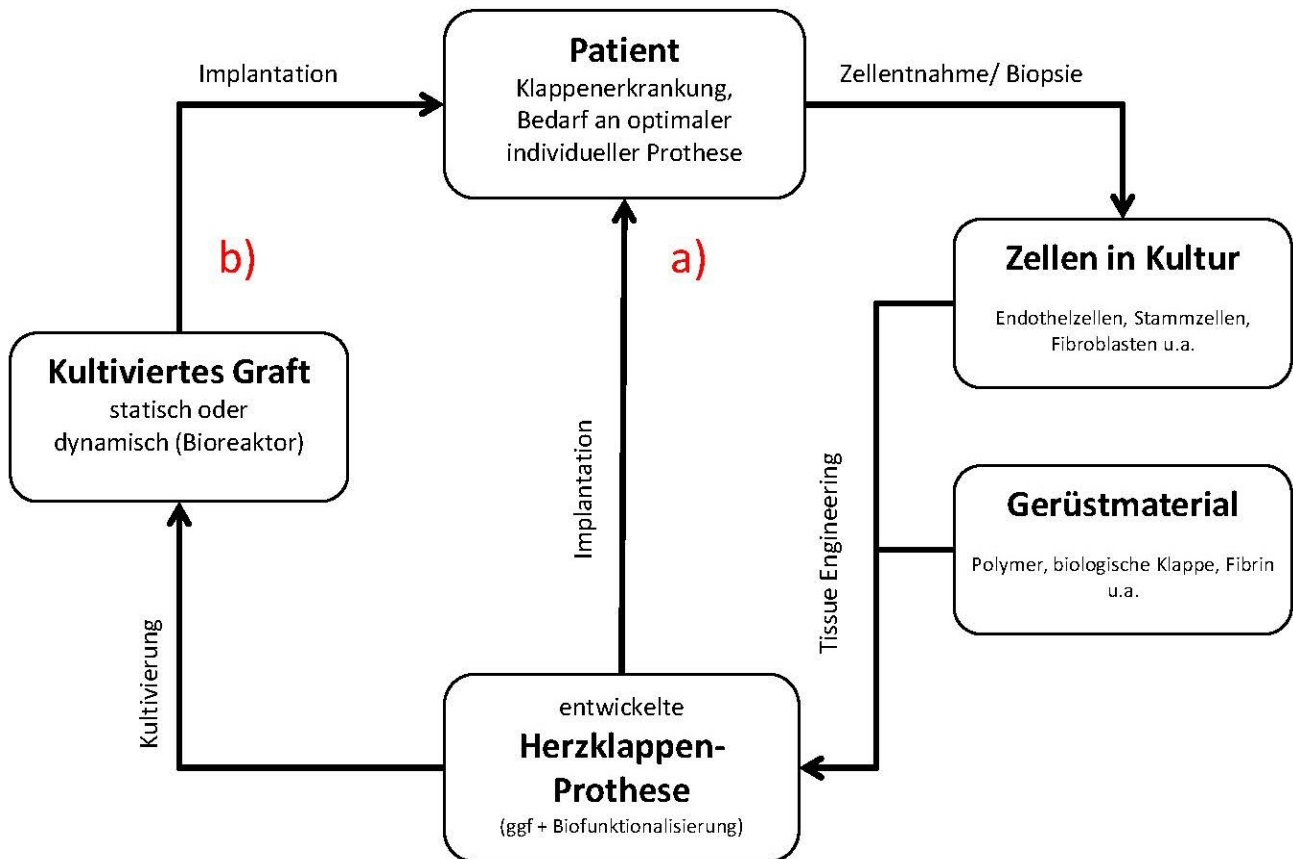
In der modernen Herzchirurgie stellt die Entwicklung von lebenslang funktionalen Prothesen sowohl für die Forscher, als auch für die klinisch tätigen Ärzte ein wichtiges Ziel dar, da aktuell über 90 Prozent der kardiovaskulär chirurgischen Therapien aus dem Ersatz oder der Reparatur von Strukturen bestehen [40]. Humane Spenderorgane stehen nur limitiert zur Verfügung und der Bedarf an optimierten Prothesen steigt. Das TE bietet die neueste Möglichkeit kardiovaskuläre Prothesen nach Idealvorstellungen zu gestalten. Hierbei sollen die Nachteile des konventionellen Herzklappenersatzes eliminiert werden und somit Prothesen ohne Thrombogenität und Kalzifizierungen sowie mit zeitlich unbegrenzter Funktionalität entwickelt werden. Eine einfache Handhabung bei der Implantation und hämodynamisch optimale Funktionen wären ebenso wichtig wie die subjektive Akzeptanz des Patienten. Durch die modernen Methoden besteht zusätzlich die Hoffnung auf vitale, mitwachsende und sich anpassende Prothesen, um auch den Einsatz bei Kindern mit lebenslangem Erfolg zu ermöglichen [3]. In der pädiatrischen Herzchirurgie ist die Haltbarkeit von Prothesen vor allem durch das körperliche Wachstum der Kinder begrenzt und Reoperationen werden notwendig. Die derzeit zur Verfügung stehenden mechanischen oder biologischen Prothesen sind avitale Strukturen, die nicht über das Potenzial von Regeneration, Wachstum oder Modellierung verfügen.

Das TE von Herzklappenprothesen teilt sich in verschiedene Ansätze. Grundsätzlich ist stets ein Gerüst notwendig, um die mechanischen Eigenschaften der nativen Herzklappen nachbilden zu können. Dieses Grundgerüst, auch als *Scaffold*<sup>5</sup>, Substrat oder Startermatrix bezeichnet, kann mit Zellen besiedelt werden und wird entweder im Verlauf durch die Zellen und die von ihnen gebildete extrazelluläre Matrix ersetzt oder es bleibt bestehen und wird von einer vitalen Oberfläche bedeckt.

---

<sup>5</sup> = Gerüst

Außerdem bestehen verschiedene Möglichkeiten der experimentellen Herstellung (Abbildung 3): beim ersten Ansatz wird die Kombination von Zellen und Gerüst vor der Implantation im Labor zu einer fertigen Prothese kultiviert, beim zweiten Ansatz wird eine Oberfläche gestellt, an welcher die Zellen das Gerüst im Organismus leicht repopularisieren können ohne eine vorherige in-vitro Kultivierung [10].



**Abbildung 3: Prinzip des Tissue Engineering**

a) Körper als Bioreaktor, b) Implantation einer endothelialisierten Prothese

Die aktuelle Forschung im Bereich des TE beschäftigt sich mit den Fragen, ob ein Polymer oder eine dezellularisierte native Klappe das bessere Grundlagenmaterial darstellt, ob die Zellen autolog sein sollten und ob sich Zellen aus der Blutzirkulation selbstständig an die Prothesen heften können [2].

Eine direkte Implantation nach Herstellung der Prothesen wird als *table-site*<sup>6</sup> bezeichnet, da alle Schritte der Entwicklung im Operationssaal stattfinden. Autologe Materialentnahme, Prothesenzellularisierung und in-vivo Implantation werden intraoperativ durchgeführt, wodurch transportbedingte Infektionen, Kosten und Produktionsdauer reduziert werden können. Anpassungen und Biofunktionalisierungen der Prothesen könnten auch kurzfristig patientenadaptiert vorgenommen werden [41][42]. Um diesen Ansatz in die Realität umsetzbar zu machen, wird an den unterstützenden Faktoren der Adhäsion und Proliferation der Zellen geforscht. Sowohl bei der Endothelialisierung in-vivo als auch durch eine vorherige Konditionierung in-vitro soll die Zellularisierung für eine Verbesserung der Biokompatibilität und der Adaptationsfähigkeit sorgen. Die Optimierung dieser Aspekte ist wichtig, um die Thrombogenität der Materialien zu senken. Dies erfordert zellbiologisch fundiertes Wissen über die Verbindungen am endothelialen Übergang zwischen den Zellen und dem Gerüstmaterial. In der nativen physiologischen Herzklappe wird an dieser Stelle eine Basalmembran gebildet, welche für mechanischen Halt und hämodynamisch optimale Funktionen sorgt [12].

Ein weiteres großes Interesse an neuen Materialien besteht durch die Verbesserungen im transkathetergestützten Bereich der Herzchirurgie. Aktuell ist diese Technik vor allem für ältere Patienten mit hohem perioperativen Risikoprofil vorgesehen. Eine geeignete TE-Prothese für jüngere Patienten könnte das minimalinvasive Verfahren, welches steigende postoperative Erfolgszahlen aufzeigt, für eine größere Patientengruppe zugänglich machen [25][43].

### 1.5.2 Prothesenmaterialien und Biofunktionalisierung

Die Anforderungen an ein ideales Grundgerüstmaterial beim TE von Herzklappen sind vielfältig. Dazu zählen in erster Linie mechanisch uneingeschränkte Funktionalität, Biokompatibilität und die Fähigkeit der Zelladhäsion. Auch die Fähigkeit zur Biodegradation mit folgendem Abtransport von Abbauprodukten ist bei vielen Konzepten von Bedeutung. Außerdem sollte das Material Unterstützung bei der Zellorganisation bieten und die Diffusion von Nährstoffen ermöglichen. Innerhalb des Gerüsts muss den Zellen ein ständiger Kontakt zum Empfängerkörper ermöglicht sein [44].

Als biologische Gerüststrukturen kommen dezellularisierte xenogene oder humane kryokonservierte Herzklappen zum Einsatz. Die ursprünglichen Zellen können mit verschiedenen Methoden entfernt werden, sodass nur die extrazelluläre Matrix zurück bleibt und die Antigenität auf diese Weise

---

<sup>6</sup> =neben dem Tisch; gemeint ist der Operationstisch

reduziert wird. Der Vorteil dieser Grundgerüste liegt in der bereits vorhandenen physiologischen Form. Biologische Matrices sind somit morphologisch und funktionell ideal, müssen jedoch dezellularisiert werden, da die Zellen die Hauptantigentträger darstellen. Werden Homografts verwendet, können zusätzlich tierische Infektionen sowie spezieübergreifende immunologische Konflikte und Klappenversagen aufgrund anatomischer Unterschiede ausgeschlossen werden, jedoch ist ihre Verwendung durch die Verfügbarkeit limitiert. Die Methodenentwicklungen der Dezellularisierung liegt derzeit bereits fast zwei Jahrzehnte zurück und wurde seitdem stetig weiter optimiert [45]. Auf diese Fortschritte bei der Matrixentwicklung folgten im Jahr 2000 erste in-vivo Erfolge im Tiermodell von allogenen, dezellularisierten Herzklappen, welche mit Myofibroblasten und Endothelzellen als modernes TE-Verfahren besiedelt wurden. Bei der Kombination von Allografts mit autologer Endothelialisierung zeigten sich im Langzeitversuch eine normale Funktion sowie die komplette Restitution des Herzklappengewebes. Ein geringer Stabilitätsverlust durch die Dezellularisierung trat jedoch auf und wird weiterhin als Nachteil der azellulären biologischen Klappengerüste diskutiert. Die Weiterentwicklung der Methoden ist wichtig, da es durch die Zellzerstörung auch zum Fehlen von wichtigen Zellverbindungen der extrazellulären Matrix kommt, welche für die Adhäsion der Zellen beim TE notwendig sind [39].

Aktuell werden bereits dezellularisierte Herzklappen tierischen oder humanen Ursprungs in verschiedenen klinischen Studien ohne weitere zelluläre Besiedelung verwendet [46][47]. Bei den Einsätzen dezellularisierter Gerüste sowohl in Aorten- als auch Pulmonalklappenposition bei überwiegend jungen Patienten zeigen sich erste vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Funktionalität, selbst nach teilweise 10jährigem Einsatz. Die weitere Langzeitperformance dieser Gerüststrukturen bleibt jedoch noch abzuwarten [43].

Künstliche Materialien bieten den Vorteil der kostengünstigen Reproduktion der Grundgerüste und zeigen damit fast unbegrenzte Verfügbarkeit. Biologische Komponenten wie Immunogenität oder Infektionen können durch den Einsatz synthetischer Materialien vermieden werden. Zu Beginn der Zellbesiedelungsverfahren von Kunstmaterialien standen anorganische Grundgerüste wie Polytetrafluoroethylen, Dacron und ein Copolymer aus Polyglycolsäure (PGA) und Polylactidsäure (PLA), welches durch seine Verwendung für bioresorbierbare Nahtmaterialien hinreichend bekannt ist [48][38]. Bei den bioresorbierbaren künstlichen Matrices stellen sich systemische Toxizität, Wachstumslimitationen, Differenzierungs- und Funktionseinschränkungen und Einwachsbarrieren als Herausforderungen dar. Für die temporäre Nutzung als Gerüstmaterialien wurden bereits viele poröse und bioresorbierbare künstliche Materialien in-vitro und in-vivo untersucht [44]. Synthetische Materialien können für verschiedene Verarbeitungsmethoden wie dreidimensionales Drucken oder Elektrosponning verwendet werden. Dabei können aus Nanofasern Gerüste entstehen, die durch ihre

fibröse Struktur die native extrazelluläre Matrix nachbilden und somit Zellen die Adaptation erleichtern [49].

Natürlich zeigen auch die synthetischen Matrices Limitationen auf. Polymeren fehlt es für die Bindung der Endothelzellen an wichtigen Proteinen der Basalmembran und an extrazellulärer Matrix, sodass die Biokompatibilität und Hämkompatibilität dieser Materialien eine Herausforderung darstellt [39][42]. Weitere Einschränkungen zeigen künstliche Materialien durch die initiale Steifheit und fehlende Flexibilität [50]. Bei der Biodegradation stellt die Veränderung der mechanischen Eigenschaften ein schwer berechenbares Risiko dar. Der häufigste Grund für das Versagen bei bioresorbierbaren Polymeren besteht aus der Schwierigkeit eine Balance zwischen Abbauphase des Gerüsts und der Autorekonstruktion der neuen Matrix zu finden [46].

Neben den künstlichen Materialien existieren mögliche Substrate für Grundgerüste aus gelartigen, bioresorbierbaren Strukturen wie Kollagen, Fibrin, Gelatin oder Alginat. Es konnten bereits Erfolge von FibrinGrundgerüsten bei in-vitro und in-vivo-Experimenten gezeigt werden. Ein großer Vorteil ist hierbei der natürliche Ursprung des Materials. Die Gewinnung aus patienteneigenem Blut und die gute Nutzbarkeit für dreidimensionale Strukturen machen Fibrin zu einem interessanten Gerüstmaterial [48][51][52][53].

Eine Möglichkeit, die Biokompatibilität zu verbessern stellt die chemische (Bio-)Funktionalisierung dar. Dies bezeichnet die Modifizierung von Werkstoffoberflächen, sodass von Zellen gebildete Ankerproteine leichter adhären können. Reaktive Moleküle sorgen bei der Biofunktionalisierung von Oberflächen für die verstärkte Interaktion und somit für eine verbesserte Zelladhäsion zwischen den verschiedenen Komponenten [26]. Eine Veränderung der Oberflächenstruktur kann sowohl an nativem Gewebe als auch an Kunststoffoberflächen vorgenommen werden und individuell an einzelne Moleküle und Funktionen angepasst werden. Als mögliche modifizierende Strukturen werden in Studien häufig Kunststoffe, Metalle und Proteine untersucht [54][55].

### **1.5.3 Spezifische Polymere als Prothesenmaterial**

Als Polymere werden lange Ketten von Makromolekülen bezeichnet, welche durch kovalente Bindungen zwischen sich wiederholenden Einheiten entstehen. Daraus ergeben sich viele Vorteile für die entstehenden Stoffe, da der Aufbau leicht modifiziert werden kann. In der Natur kommen Polymere beispielsweise in Form von Fibrin, Kollagen, Dextran oder Gelatin vor. Synthetische Polymere können bioresorbierbar sein und finden eine vielseitige Verwendung in der Medizin, vor allem im Bereich der Hygiene als Einwegartikel, als Implantate oder in der Gewebezüchtung. Sie

sollten für diese Zwecke biokompatibel, mechanisch wertvoll, sterilisierbar und langzeitstabil sein [26].

Bioresorbierbare Polymere werden in der Medizin bereits als Nahtfäden, Klebstoffe oder temporäre Implantate verwendet, sowie als Trägerwerkstoffe in der Pharmazie. Die Degradationsprodukte werden im Verlauf durch Polymerauflösung, Hydrolyse oder enzymatischen Abbau in den biologischen Kreislauf aufgenommen. **Polycaprolacton (PCL)** gehört zu den synthetischen aliphatischen Polyestern. Wegen der geringen Kosten, guter Biokompatibilität, adäquaten mechanischen Eigenschaften und einer langsamen hydrolytischen Biodegradation nach mehr als 24 Monaten wird es häufig in der Medizin genutzt. Es zeigt sich hydrophob, nicht-toxisch und gut geeignet für dreidimensionales Drucken oder Elektrosponnen. **Poly lactid (PLA<sup>7</sup>)** ist ebenfalls ein hydrophobes, aliphatisches Polyester und wird in der medizinischen Forschung oft verwendet [56]. Es kommt als **Poly-L-Lactid (PLLA)** oder D-Lactid vor. Die Degradation erfolgt hydrolytisch, wobei die Abbauprodukte in Form von Kohlenstoffdioxid über die Atmung abgegeben werden. In der bisherigen Verwendung als Implantate zeigen sich jedoch beim Einsatz von Polylactid geringe Entzündungsreaktionen und Bindegewebsbildung sowie ein Verlust von mechanischer Stabilität aufgrund der schnellen Degradation [26][53]. **Polyamid-6 (PA-6)** ist ein Polymer aus der Gruppe der Polyamide und unter dem Handelsnamen *Perlon* bekannt. Polyamide finden derzeit in der Medizin Verwendung als Nahtmaterial, in Schläuchen und Dialysegeräten, als Spritzen und als Mitralklappen. Es zeigt sich teilkristallin, mit hoher Festigkeit und Steifigkeit, einem hohen Verschleißwiderstand und guten Gleiteigenschaften. Die verschiedenen Polyamide nehmen 1 bis 3,5% Wasser auf. Aliphatische Polyamide wie das PA6 sind bisher in Experimenten nicht mutagen oder zytotoxisch und zeigen für Kurzzeitimplantate eine ausreichende Biokompatibilität. Nach längerer Zeit kann jedoch auch bei den nicht bioresorbierbaren Polymeren eine Degradation eintreten [26].

### 1.5.4 Zellquellen

Für die Entwicklung von gezüchteten Herzklappenprothesen bietet sich eine Vielzahl an Zellarten an. In den letzten Jahrzehnten haben die Medizin und die Zellbiologie unzählige Verfahren zur Zellentnahme, Isolation und Kultivierung entdeckt und erprobt. Die Fortschritte im Bereich der Zellforschung und im Wissen um die Differenzierung von Zellen zeigen eine erstaunlich rasante Dynamik, bei welcher im Fokus stets eine einfache Handhabung mit dennoch vielfältigen Möglichkeiten steht. Embryonale Stammzellen eignen sich durch ihre Pluripotenz und die Differenzierungsmöglichkeit in Kardiomyozyten für das kardiovaskuläre TE, verfügen jedoch aufgrund

---

<sup>7</sup> engl. Polylactid acid



von ethischen Bedenken und wegen des Risikos der Induktion von Tumoren sowie der Immunogenität ebenso über Nachteile. Multipotente Zellen, wie die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks besitzen durch ihr regeneratives Potenzial bereits einen hohen Stellenwert im kardiovaskulären TE. Ebenso wird mit steigendem Interesse das Potenzial der Nabelschnurblutzellen erkannt. Nutzbar sind außerdem hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarkes sowie die abgeleiteten endothelialen Progenitorzellen aus Knochenmark und Blut. Diese sorgen für Neovaskularisation und sind regenerativ aktiv. Kardiale Stammzellen erscheinen ebenso wie die interstitiellen Zellen der Herzklappen morphologisch ideal. Ihre Gewinnung und Kultivierung sind jedoch häufig sehr herausfordernd [48][53].

Die Zellen des Geburtsgewebes sind aktuell die großen Hoffnungsträger der Forschung und vor allem für das kardiovaskuläre TE aussichtsreich, da sie endotheliale Strukturen bilden können. Aufgrund des jungen Alters des Gewebes bietet es eine hohe Plastizität und steht bereits für pädiatrische Patienten als wenig invasiv erreichbare Zellressource zur Verfügung. Pränatal können minimalinvasiv fetale Zellen der Plazenta, der Amnionflüssigkeit sowie des Nabelschnurblutes für das TE genutzt werden. Zellen aus der Amnionflüssigkeit konnten im Labor differenziert werden und wiesen Eigenschaften von Myofibroblasten oder Endothelzellen auf. Auch die Fruchtwasserzellen zeigten sich als vielversprechende pränatale Quelle für postpartal bereitstehende Prothesen [57][58]. Postpartum steht die komplette Nabelschnur als Zellressource ohne invasive Maßnahmen zur Verfügung. Nicht nur in der präklinischen Forschung eignet sich die Nabelschnur als ideale Zellquelle, sondern auch für die spätere klinische Umsetzung. Die Vorteile von Zellen, die der Nabelschnur entspringen sind für das kardiovaskuläre TE vielfältig. Die Nabelschnur bietet verschiedene differenzierte und nicht-differenzierte Zelltypen, inklusive Vorläuferzellen an, die ein exzellentes Wachstumspotential zeigen [44]. Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs)<sup>8</sup> sind bereits ausdifferenziert und können endovaskuläre Oberflächen nachbilden. Sie stellen daher eine Standardquelle für die Isolation von Endothelzellen dar, welche im kardiovaskulären TE von großer Bedeutung sind [42][59]. Untersuchungen zeigen, dass eine Kryokonservierung auf die Vitalität der Zellen keinen negativen Einfluss hat und kryokonservierte Nabelschnurzellen daher für eine Lagerung mit dem anschließenden Einsatz zum idealen Operationszeitpunkt geeignet sind. Dies ist für pränatal entdeckte kongenitale Herzfehler von Bedeutung, falls eine operative Korrektur nicht direkt postpartum vorgenommen werden soll oder kann [59].

Aus humanen Nabelschnüren lassen sich relativ einheitliche Primärzellkulturen gewinnen und durch die anonyme Bereitstellung stellen die Nabelschnüre eine einfach zugängliche Quelle dar. Die

---

<sup>8</sup> engl. *human umbilical cord vein endothelial cells*

Isolation von Endothelzellen wird jedoch häufig erschwert durch mögliche Kontaminationen mit Erythrozyten oder durch das Auftreten von glatten Muskelzellen in der Zellkultur. Desweiteren neigen Endothelzellen bei der enzymatischen Isolation oder der Subkultivierung zu Verklumpung. Das schnelle Wachstum der HUVECs sorgt für eine große Zellausbeute aus einer Nabelschnur. Für den klinischen Einsatz erscheint demnach die Besiedlung einer Herzklappenprothese aus nur einer Nabelschnur möglich [60].

### 1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Da die aktuellen Zahlen für Deutschland eine weiter steigende Notwendigkeit an Herzklappenoperationen aufzeigen und sich auch der kardiochirurgische Bereich vermehrt zu einer minimalinvasiven, patientenorientierten Medizin entwickelt, muss auch die Prothesenentwicklung der Labore weiter fortschreiten [25]. Die Entwicklung von individualisierten, wachsenden und mechanisch belastbaren Herzklappenprothesen soll durch die Forschung an der Endothelialisierung und der Matrixproteinsynthese sowie durch die Arbeit an mechanisch stabilen Gerüstmaterialien vorangetrieben werden. Wie bisherige Ergebnisse zeigen, hilft das Verständnis von Zellinteraktionen mit biologischem oder künstlichem Material enorm bei der Umsetzung der Ergebnisse aus den Laboren in die Kliniken der Herzchirurgie [42][3].

In dieser Arbeit werden verschiedene Ansätze des TE miteinander kombiniert und in vitro untersucht. Als Vorstufe zu Experimenten im Flussreaktor oder im Tierversuch sollen die grundlegenden Untersuchungen zur Biokompatibilität von synthetischen Materialien statisch im Labor durchgeführt werden. Dabei stehen das Zellüberleben auf verschiedenen Polymersubstraten aus Nanofasern mit Entwicklung einer gesunden Endothelschicht und die Frage nach einer physiologischen Basalmembranentwicklung an der Übergangsfläche zwischen Zellen und Gerüstmaterial im Fokus. Es soll herausgefunden werden, welche Zellvorgänge stattfinden, ob Proteine exprimiert werden und ob dies substratspezifisch verläuft.

Als Zellquelle werden Endothelzellen aus Nabelschnüren isoliert. Anschließend werden durch ein optimiertes Sprühverfahren Polymervliesen zellularisiert. Das standardisierte Sprühverfahren mit einem Endothelzell-plus-Fibrin-Hydrogel wurde im Vorfeld von der Arbeitsgruppe unseres Labors um Dr. Christian Klopsch entwickelt [61]. Ob die HUVECs das fremde Material als Wachstumsbasis akzeptieren und eine 14tägige Kultivierung vital überstehen, wird die wichtigste Fragestellung der Untersuchungen sein. Um die Adhäsion der Endothelzellen im später vorgesehenen table-site-

Verfahren zu fördern, wird der Effekt des Basalmembranproteins Laminin-1 auf die Endothelialisierung und die Matrixbildung der Zellen untersucht. Diese Form der Biofunktionalisierung wird an Polymerfolien vorgenommen, welche durch das Elektrosponningverfahren produziert werden sollen.

Vor und nach den Zellversuchen werden die mechanischen Eigenschaften der Polymervliese charakterisiert, um eine Aussage zur Funktionalität der Materialien und des Herstellungsverfahrens treffen zu können. Zur detaillierten Analyse der Zellvorgänge nach der statischen Kultivierung werden Licht- und Elektronenmikroskopie, Immunhistologie sowie qRT-PCR<sup>9</sup>-Methoden angewendet. Dabei sollen besondere Schwerpunkte der Analyse auf die Zellvitalität und die Zelladhäsion an der Oberfläche der Kunstmaterialien während des Endothelialisierungsprozesses gelegt werden.

---

<sup>9</sup> *engl.* (quantitative) reverse transcription polymerase chain reaction = (quantitative) reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

## 2. Material und Methoden

Tabelle 1: Materialien und Geräte allgemein

### Materialien und Geräte Allgemein

Bezeichnung	Name	Firma (Ort)
<b>Standardlösungen und Puffer</b>		
Händedesinfektionsmittel Ethanol 70%	AHD 2000®	Lysoform (Berlin, Germany) Zentralapotheke Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Ethanol absolut (100%)		Zentralapotheke Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Dulbecco's - PBS (=phosphat buffered saline) Aqua (destilliert, steril)	D-PBS (w/o Calcium, w/o Magnesium)	PAN™ Biotech (Aidenbach, Germany) B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Germany)
<b>Geräte / Materialien</b>		
Wasserbad		Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Germany)
Laminare Sicherheitswerkbank	Safeflow 1.2	Nunc™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Bechergläser		Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Große Zentrifuge	Multifuge 1 S-R	Heraeus, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tubeständer		neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Germany)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Glaspipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen, Deutschland)
Pipetten 0,5-10µl, 10-100µl, 100- 1000µl		Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Neubauerzählkammer		Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda Königshofen, Germany)
Inkubator		BINDER GmbH – Headquarters (Tuttlingen, Deutschland)
Glasflaschen		SIMAX® (Selb, Germany)
Absaugsystem mit Vakuumpumpe	Vacusaft comfort	IBS Integra Biosciences Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Filter für Pumpe	Steritop™ 0,22µm	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
Kleiner Filter	Nalgene Syringe Filter 0,2µm	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Pinzetten aus Edelstahl		Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)

### Fortführung von Tabelle 1:

#### Verbrauchsmaterialien

Handschuhe	Peha-soft nitrile Powder-free exam gloves	Hartmann Kimberley-Clark(Mainz, Deutschland)
Pipettenspitzen(1000µl, 200µl)	TIPS	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	CELLSTAR® TUBES	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Eppendorf-Tubes (2ml; 1,5ml; 0,5ml)		Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Kryotubes	CryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

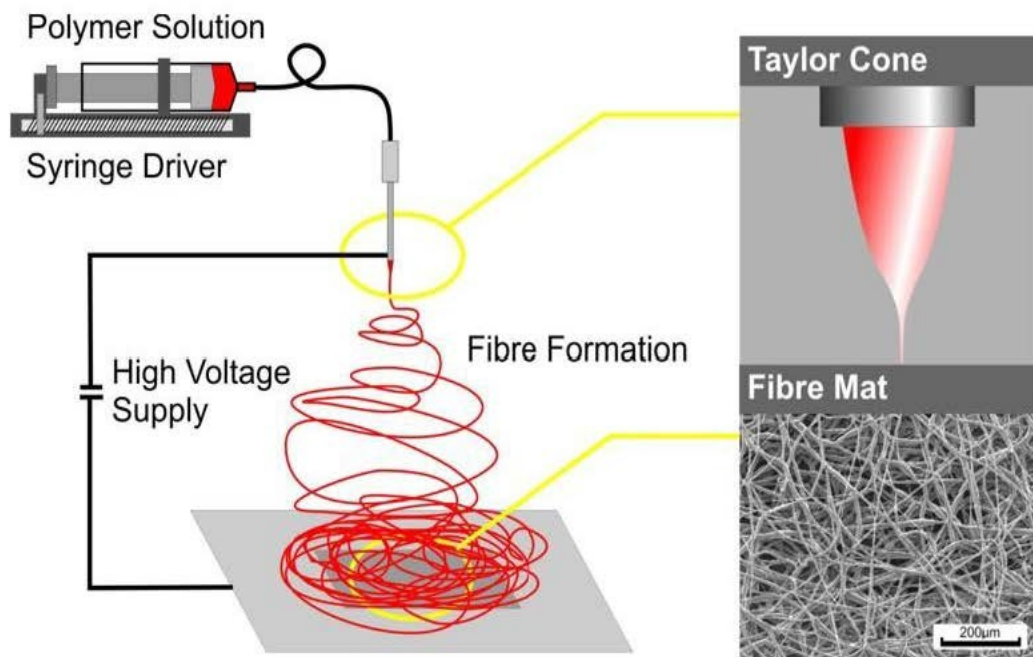
#### Software

ImageJ		Open Source ( <a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a> )
Leica Application	Software ZEN 2010D für ELYRA PS MIKROSKOP	Leica Microsystems (Wetzlar, Germany)
Microsoft Publisher		Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Excel		Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Word		Microsoft (Redmond, USA)

## 2.1 Polymervliese

### 2.1.1 Herstellung der Polymervliese

Als Vliesstoff oder Vliese werden im Allgemeinen Folien mit einer Grundstruktur aus feinem Fasernetz bezeichnet. Die Herstellung der verwendeten Polymervliese als Grundsubstrat für die Zellularisierung und Biofunktionalisierung erfolgte durch das Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock (IBMT) mit dem Elektrosponningverfahren (Anlage NS LAB 200 der Firma Elmarco). Für diese Methode werden Polymere in Lösung gebracht, welche durch elektrostatische Kräfte zu einem Strahl geformt wird und somit Nanofasern gesponnen werden können. Dabei wird das Prinzip der uniaxialen Dehnung einer viskoelastischen Lösung genutzt. Der Aufbau der Elektrosponning-Anlage besteht aus einer Spritze, die als Reservoir für das Lösungsmittel mit dem gelösten Polymer gilt, einem Perfusor, der eine gleichmäßige Flussrate (0,5-10 ml/h) der Lösung gewährleisten soll, einer Hochspannungsquelle mit Gleichstrom (5-30kV) und einem Kollektor, der die Fasern einsammelt. An der Kanülenspitze bildet sich ein Tropfen, der durch die elektrostatischen Kräfte zu einem Kegel, dem sogenannten *Taylor Cone* geformt wird. Sobald die Oberflächenspannung überschritten wird, bildet sich ein kontinuierlicher Strahl, der durch das Verdampfen des Lösungsmittels erstarrt und in Faserform im Nano- oder Mikrometerbereich aufgefangen werden kann.



**Abbildung 4: Prinzip des Elektrospinning**

Abbildung aus Wallace et al. [62]

Elektrospinning-Verfahren; *Polymer solution*= Polymerlösung, *Syringe Driver*= Spritzenpumpe, *Fibre Formation*= Faserbildung, *High voltage supply*= Hochspannungsversorgung, *Taylor cone*= Taylor-Kegel, *Fibre mat*= Fasermatte

Das Elektrospinningverfahren bietet viele Möglichkeiten zur Herstellung variabel anpassbarer Vliese. Die Faseranordnungen können durch Manipulationen des elektrischen Feldes oder unterschiedliche Kollektortypen ausgerichtet werden. Weitere mögliche Varianten sind poröse Fasern, bandförmige Fasern oder koaxiales Spinnen von zwei verschiedenen Stoffen zugleich. Diverse Parameter wie Spannung, Flussrate und der Abstand zwischen Nadel und Kollektor können die Eigenschaften der gesponnenen Vliese modifizieren. Aber auch Temperatur, Luftfeuchte, Konzentration und damit Viskosität des Polymers haben einen Einfluss auf das Faserergebnis. Aufgrund dieser vielen Variablen verteilt sich derzeit noch sechzig Prozent der Elektrospinningvorgänge auf die Grundlagenforschung. Zwanzig Prozent der Verfahren werden aber bereits für den Einsatz in der Medizintechnik durchgeführt. Im TE werden die Nanofasern als Grundsubstrate für dreidimensionale Gerüste gebraucht. Durch ihren Aufbau imitieren die elektrogewonnenen Fasern die Zellumgebung und helfen so bei der Zelladhäsion. Da sie eine extrazelluläre Matrix nachahmen sollen, wird eine hohe Biokompatibilität und Resorptionsfähigkeit, eine poröse Struktur, ein hohes Oberflächen-Volumen-

Verhältnis sowie adäquate mechanische Eigenschaften, Oberflächenmodifizierbarkeit und eine einfache Reproduzierbarkeit von den Nanofasern und den gebildeten Vliesen gefordert [26][56][63].

Vom IBMT wurden für diese Arbeit Polymervliese aus PLLA (durchschnittliches Molekulargewicht von 315,000 g/mol, Evonik Industries AG, Essen, Germany) und PA-6 (Dichte nach ISO 1183 1,12 – 1,15 g/cm<sup>3</sup>, BASF SE, Ludwigshafen, Germany) sowie PCL (Molekulares Gewicht 87000 g/mol, Firma Perstorp Holding AB, Schweden) mit dem Elektrosponningverfahren produziert. Aus zunächst eckigen Folien (15 x 10 cm) mit zufälliger Faseranordnung und unterschiedlicher Dicke (40-60µm) wurden für die Experimente runde Stanzen (15 mm Durchmesser, 1,77cm<sup>2</sup> Fläche, siehe Abbildung 5) angefertigt und in 100prozentigem Ethanol für mindestens 24 Stunden desinfiziert.



**Abbildung 5: Gesponnene Polymervliese**

Ausgestanzte Vliese, 15mm Durchmesser, PCL, vor Zellularisierung

### 2.1.2 Physikalische Charakterisierung der Polymervliese

Die mechanischen Eigenschaften der ausgewählten Polymervliese wurden von Dipl. Physikerin Daniela Arbeiter vom IBMT der Universität Rostock im Labor für Polymerphysik untersucht. Dazu wurden die Polymervliese vor der Kultivierung sowie 14 Tage nach der in-vitro Biofunktionalisierung und Zellularisierung auf ihre physikalischen Belastungsmöglichkeiten untersucht. Nach dem Trocknen im Vakuumofen bei 40° Celsius wurden die Proben aller Substanzarten in physiologische Kochsalzlösung bei 37° Celsius getaucht und die mechanische Kraft wurde mit uniaxialen Zugbelastungstests mit der Zugprüfmaschine *Zwicki ZN 2.5* (Zwick, Ulm, Germany) wie durch die Arbeitsgruppe in vorherigen Arbeiten beschrieben, analysiert [64]. Die Untersuchungen wurden mit einem Kraftaufnehmer mit

50N Nennkraft und einer Zuggeschwindigkeit von 12 mm/min durchgeführt. Die Ergebnisse der Polymergewebe wurden denen von Aorten- und Pulmonalklappentaschen weiblicher Schweine (6-8 Monate, Gewicht 110-122kg) zur Kontrolle gegenübergestellt. Das native Material wurde freundlicherweise vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (Dummerstorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt und innerhalb einer Stunde nach Entnahme mit uniaxialen Belastungstests entlang der Hauptfaseranordnung analysiert. Anschließend wurden Spannungs-Dehnungs-Diagramme<sup>10</sup> der Materialien erstellt und ausgewertet. Die Dehnung wird darin als dimensionslose Größe in Prozent angegeben, die Spannung in der Einheit Megapascal (MPa). Ein MPa entspricht 1N/mm<sup>2</sup>.

### 2.2 Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene: Isolation und Zellkultur

*Tabelle 2: Materialien und Geräte Zellisolation*

#### Zellisolation

(von „Materialien und Geräte allgemein“ abweichende Materialien)

Bezeichnung	Name	Firma (Ort)
<b>Lösungen und Puffer</b>		
Basales Endothelzellmedium	EBM™-2 Basal Medium,	Lonza Group AG (Basel, Switzerland)
Endothelzellmedium mit Zusätzen, 0,2-µm-gefiltert	EGM™-2 Medium,	Lonza Group AG (Basel, Switzerland)
Nabelschnurpuffer (1:10 mit Aqua dest. verdünnt), 0,2-µm-gefiltert	CB -, Cord Buffer, Anleitung im Anhang	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kollagenase	0,05% Clostridium histolyticum collagenase	
Trypsin/EDTA Puffer zur Ablösung der adhärennten Zellen	Trypsin plus EDTA (10x)	GE Healthcare (Buckinghamshire, United Kingdom)
Freezing Medium	Recovery™-Cell culture freezing medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Trypanblau	Trypan Blue Solution, 0,4%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Penicillin-Streptomycin		PAN™ Biotech (Aidenbach, Germany)
<b>Geräte/ Materialien</b>		
Steriles Nabelpräparationsset	2 Klemmen, grüne Tücher, 2 Ventile, Kabelbinder, Alufolie, alles autoklaviert	Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Kanülen	BD Microlance™3	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Germany)
Zellkulturflaschen (25cm²=50ml, 75cm²=250ml, 175cm²=650ml)	CELLSTAR® Cell culture flasks	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzen 20, 50ml	BD Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Germany)
Einmalskalpell	Präzisa Plus	Dahlhausen (Köln, Germany)

<sup>10</sup> engl. *Stress-Strain-Curves*



Die Entnahme der biologischen Materialien für die Experimente dieser Arbeit wurde durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock bewilligt. Bei der Arbeit mit Zellkulturen wurde stets auf sichere und sterile Bedingungen geachtet, um Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen und Mykoplasmen zu vermeiden [60]. Die verwendeten HUVECs wurden aus humanen Nabelschnüren isoliert, welche von gesunden Müttern unmittelbar nach Geburt per Sectio Caesarea freiwillig und unter schriftlicher Information und Zustimmung anonym gespendet wurden (siehe Anhang 7.2). An dieser Stelle gilt der Dank den Müttern sowie dem Team des Kreißsaals der Universitätsfrauenklinik Rostock für die Hilfsbereitschaft. Bedingungen für die erfolgreiche Isolation sind eine mindestens 10cm lange Nabelschnur, die kühle Lagerung in steriler gepufferter Salzlösung (PBS)<sup>11</sup> und die Durchführung der Isolation innerhalb von vier Stunden post partum.

Die menschliche Nabelschnur besteht aus zwei Arterien für den Abtransport von Kohlendioxid zur Plazenta und einer Vene für den Sauerstofftransport zum Kind. Für die Isolation der HUVECs aus der Vene wurde ein modifiziertes Protokoll nach Jaffe et al. [65] verwendet. Die Nabelschnüre wurden nach sterilem Transport in PBS auf Löcher oder Klemmstellen geprüft, abgeblutet, mit Ethanol äußerlich gereinigt und die beiden Enden wurden steril mit einem Skalpell entfernt. Das erste Ventil des Isolationssets wurde in die Vene eingeführt, mit einem Kabelbinder befestigt und die Nabelschnur vorsichtig mit gefilterter Nabelschnurpufferlösung (CB-, Cord Buffer, siehe Anhang 7.1-I.) gespült. Nach dem Einführen des zweiten Ventils wurde erneut mit CB- gespült, um die korrekte Lage der Ventile in der Vene zu überprüfen. Die eigentliche Lösung der venösen Endothelzellen erfolgte durch ein kombiniertes enzymatisches und mechanisches Verfahren. Die Nabelschnur wurde unter Druck durch Abklemmung der beiden Ventile bei 37° Celsius für 11 bis 13 Minuten mit Kollagenase (0,05%) inkubiert und danach zügig durchwinkt, um die Endothelzellen zu lösen. Die gelösten HUVECs wurden in 37° Celsius warmem Medium gesammelt, für 10 Minuten bei 300xg zentrifugiert und zuletzt in 5 ml Medium resuspendiert. Nach der Isolation wurden die HUVECs bei 37° Celsius und einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> in endothelialem Wachstumsmedium in Zellkulturflaschen kultiviert. Das für die HUVEC-Zellkultur verwendete Medium besteht aus einem basalem Endothelzellmedium mit zugesetzten Faktoren (siehe Anhang 7.1-II.) sowie 1% Penicillin-Streptomycin. Um endothelspezifische Wachstumsfaktoren nicht zu maskieren wurde der Gehalt an fetalem Kälberserum im Medium für die Endothelzellkulturen auf 10% reduziert [60]. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt und die Zellen, um eventuelle Erythrozytenverunreinigungen zu lösen, mit PBS gewaschen. Zur Kontrolle wurde die Oberfläche der Kulturflaschen vor und nach jedem Mediumwechsel unter dem Lichtmikroskop geprüft. Mit steigender Konfluenz verändert sich das morphologische Erscheinungsbild der HUVEC-Zellkultur. Von zunächst fibroblastenähnlicher

---

<sup>11</sup> engl. phosphat-buffered-saline

Struktur wandelt sich die Morphologie in das typische Kopfsteinpflaster-Muster von Endothelzellkulturen [66].

Um den Zellen in ihrem Wachstum ausreichend Platz und Nährstoffe zur Verfügung stellen zu können, wurden die HUVECs unter Nutzung von Trypsin (Trypsin plus EDTA, 10%ig konzentriert, in PBS gelöst) bei einer Konfluenz von ungefähr 75% passagiert. Nach dem Erreichen von mehr als 75% Konfluenz in der zweiten Passage wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff für die Langzeitaufbewahrung eingefroren. Für die Zellzählung wurde hierbei Trypanblau und die Neubauerzählkammer verwendet. Pro Milliliter Gefriermedium wurden eine Million Zellen pro Kryotube ( $1 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml Einfriermedium) bei zunächst  $-80^\circ$  Celsius und später bei  $-196^\circ$  Celsius in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Experimente wurden die Zellen in Passage drei langsam bei  $37^\circ$  Grad Celsius im Wasserbad aufgetaut, wie zuvor kultiviert und bei ausreichendem Wachstum erneut passagiert. Kurz vor der Zellularisierung der Polymervliese wurden die HUVECs verschiedener Nabelschnüre gepoolt und bei einem pH von 7,0 für weniger als 10 Minuten in PBS aufbewahrt, sodass sich die HUVECs während der Zellkultur auf den Polymervliesen einheitlich in Passage fünf befanden.

### 2.3 Oberflächenmodifikation der Polymere

#### 2.3.1 Endotheliale Zellularisierung

Tabelle 3: Materialien und Geräte Zellularisierung

##### Zellularisierung

(von „Materialien und Geräte allgemein“ abweichende Materialien)

Bezeichnung	Name	Firma
<b>Lösungen und Puffer</b>		
Fibrinhydrogel; 50 µl pro Oberfläche		Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen (Aachen, Germany)
Tranexamsäure; 50µg/ml		Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
<b>Geräte/ Materialien</b>		
OP Besteck steril		Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Maslanka Spray Pen + Applikationshilfe Konnektor Gashahn	Maslanka® Spray Pen	H. + H. Maslanka (Tuttlingen, Germany) Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Petrischalen	Glaspetrischalen	Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Sterile Kompressen	Gazin®	Lohmann&Rauscher (Neuwied, Germany)
Wellplatten (24er)	CELLSTAR® Well cell culture plate, sterile with lid	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Plastikschlauch		Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Spritzen, 1ml	Injekt®-F Tuberkulin	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Germany)
Sterile Handschuhe	Protexis™ Latex	Cardinal health (Dublin, Ireland)

Das verwendete Sprühverfahren für die Zellularisierung der Polymervliese wurde von Klopsch et al. unter der Bezeichnung SaBP<sup>12</sup> für die Herstellung einer neuen Generation von TE-Herzklappenprothesen entwickelt und mit einem Laserdruckverfahren in vitro verglichen. Das SaBP bietet eine effiziente Aussaattechnik für unterschiedliche Prothesen, bei welcher Zellen und Fibrin simultan gesprüht werden können. Die Proben wurden unter statischen und dynamischen Bedingungen in-vitro im Bioreaktor überwacht. Das SaBP zeigte ein flexibles und anhaftendes Zell-Fibrin-Gemisch, eine deckende Zelloberfläche, Proliferation der Zellen sowie eine komplette homogene Verteilung auf der Oberfläche des Polymers. Das Sprühverfahren könnte somit prinzipiell

<sup>12</sup> Abkürzung für *spray-assisted bioprocessing* = sprühassistierte Bioprozessierung

eine intraoperative Herstellung von Prothesen ermöglichen und Kontaminationen beim Herstellungsprozess sowie Kosten und Zeit während der Operation vermeiden [42].

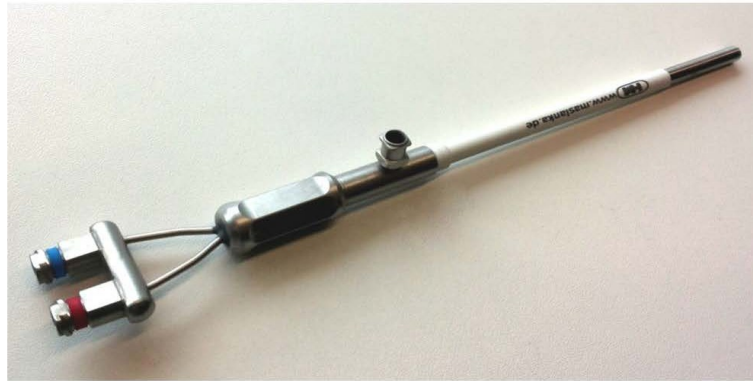
Für die Experimente dieser Arbeit wurde der dreikanalige Maslanka® Spray Pen (siehe Abbildung 6) verwendet, welcher die Möglichkeit eines simultanen Sprays aus flüssigem Fibrinogen und einem Aktivierungsreagenz inklusive Zellen bei einstellbarem Gastyp und Gasdruck bietet. Das Fibrinogen wird in einer Konzentration von 10mg/ml bei einem pH-Wert von 7,0 verwendet. Das Aktivierungsreagenz besteht aus  $\text{CaCl}_2$ , dreifach gepufferter Kochsalzlösung und Rinderthrombin mit einem pH-Wert von 7,0. Für die Vorbereitung des Sprühverfahrens wurden HUVECs zum Aktivierungsreagenz hinzugefügt und  $\text{CO}_2$  als Gas gewählt, wie in den Konzepten des Labors für kardiovaskuläre Implantate beschrieben [41][42]. Ebenfalls wurde in Studien zuvor die Sprühqualität dieser Methode überprüft und ein optimaler Gasdruck von 2 Bar etabliert [61].

Alle Komponenten des humanen Fibrinhydrogels (Fibrinogenlösung, TBS,  $\text{CaCl}_2$ , Thrombinlösung) wurden für die Zellularisierungen von der RWTH University Aachen<sup>13</sup> bereitgestellt und wie von Moreira et al. beschrieben hergestellt [67].

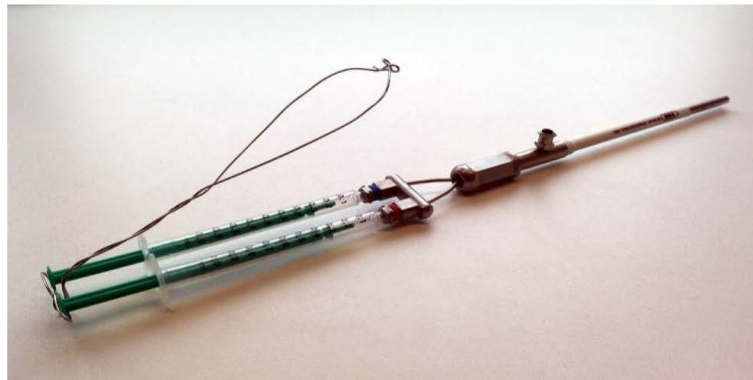
Die runden Stanzen der verschiedenen Polymergewebe wurden nach Ethanoldeinfektion dreimal in PBS gewaschen und für die Zellularisierung in Petrischalen vorbereitet. Für die elektrogesponnenen Polymervliese wurde die HUVEC-Dichte auf  $4 \times 10^6$  Zellen pro ml gesprühte Zell-plus-Fibrin-Mischung beziehungsweise  $2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  Oberfläche festgelegt. Das Endothelzell-Fibrin-Gemisch wurde als EC-Fib definiert. Die Proben wurden von beiden Seiten auf den Oberflächen mit dem Maslanka® Spray Pen unter sterilen Bedingungen besprüht und in 24er Wellplatten für 14 Tage mit Endothelzellmedium kultiviert. Während der statischen in-vitro Experimente wurde das Wachstumsmedium mit Tranexamsäure (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zur Verhinderung der Fibrinolyse versetzt und oberflächenbedeckend in den Wellplatten dreimal pro Woche gewechselt.

---

<sup>13</sup> Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen



A: Maslanka® Spray Pen



B: Maslanka® Spray Pen mit Spritzen und Applikationshilfe

**Abbildung 6: Maslanka® Spray Pen**

A: Maslanka® Spray Pen; B: Maslanka® Spray Pen mit Spritzen und Applikationshilfe

### 2.3.2 Lamininbeschichtung

*Tabelle 4: Materialien und Geräte Lamininbeschichtung*

#### **Lamininbeschichtung**

(von „Materialien und Geräte allgemein“ abweichende Materialien)

Bezeichnung	Name	Firma
<b>Lösungen und Puffer</b>		
Laminin-1 ( <i>Stammlösung 10 µg/ml, Konzentration 4 µg/ml</i> )	Sigma Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Rinderserum, BSA 0,2%	bovine serum albumin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Zellkulturplatten (24er)	CELLSTAR®Well cell culture plate, sterile with lid	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Parafilm	Parafilm®“M” Laboratory film	Bemis® (Neenah, USA)

Zunächst wurde in Vorversuchen im Rahmen einer Masterarbeit von Herrn Thomas Michael die optimale Laminin-1-Konzentration für die Adhäsion von HUVECs in Zellkulturplatten untersucht. Dabei erreichte eine Inkubation über Nacht mit Laminin-1 aus dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor bei einer Konzentration von 4µg/ml die besten Ergebnisse [61].

Aufgrund dieser Analysen wurden in unseren Experimenten desinfizierte und gewaschene Stanzen aus PA-6 vor der Zellularisierung über Nacht in einer Laminin-1-Lösung mit einer Konzentration von 4µg/ml in Wellplatten inkubiert, um eine oberflächlich adsorbierende Laminin-1-Biofunktionalisierung der Vliese zu erreichen. Hierfür wurde die Arbeitslösung aus der Stammlösung in PBS vorbereitet und in einer Zellkulturwellplatte über die Polymervliese deckend pipettiert. Über Nacht erfolgte die Beschichtung durch Inkubation unter der sterilen Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur luftdicht verschlossen, um eine Austrocknung zu vermeiden. Nachfolgend wurde der Überstand entfernt, die Vliese dreimal mit PBS gespült und die freien Bindungsstellen der Polymeroberflächen mit gefiltertem 0,2%igem Rinderserum durch zweistündige Inkubation blockiert. Vor der Zellularisierung fand erneut eine dreifache Spülung der Polymervliese mit PBS statt.

### 2.4 Auswertungsmethoden

#### 2.4.1 Oberflächenanalyse mit dem Rasterelektronenmikroskop<sup>14</sup>

Das REM wurde für Aufnahmen der gesponnenen Polymernanofasern und für Kontrollaufnahmen der Vliese 24 Stunden sowie 14 Tage nach Zellularisierung verwendet. Für die Rasterelektronenmikroskopie der in-vitro kultivierten Proben wurde das Fixiermedium vom IBMT der Universitätsmedizin Rostock gestellt (siehe Anhang 7.1-VI.). Das Endothelzellmedium wurde abpipettiert, die Proben mit dem Fixiermittel bedeckt und bei 4° Celsius gelagert. Im IBMT fand eine Entwässerung und Trocknung statt (siehe Anhang 7.1-VI.), bevor die Proben für das Mikroskop mit zerstäubtem Gold bedeckt (Sputter coater (Agar Scientific, United Kingdom)) wurden. Es wurden Aufnahmen der Polymerfolien in verschiedenen Vergrößerungen am REM (SEM Quanta™ FEG 250, FEI Company (Niederlande)/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)) angefertigt.

---

<sup>14</sup> Abkürzung: REM

### 2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

*Tabelle 5: Materialien und Geräte Gefrierschnitte*

#### Gefrierschnitte

(von „Materialien und Geräte allgemein“ abweichende Materialien)

Bezeichnung	Name	Firma
<b>Geräte/ Materialien</b>		
Einfrierstempel, Haltestab, Objektträgerbox, Bleistift, Pinzette, Pinsel, Klebeband, Aluminiumfolie		Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Stickstoffbehälter + flüssiger Stickstoff		Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Kryotom	Leica CM1900	Leica Microsystems (Wetzlar, Germany)
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Einfriermedium	Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen, Germany)
Adhäsionsobjektträger	Menzel-Gläser Superfrost®Plus	Thermo scientific, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

*Tabelle 6: Materialien und Geräte Fluoreszenzmikroskopie*

#### Fluoreszenzmikroskopie

(von „Materialien und Geräte allgemein“ abweichende Materialien)

Bezeichnung	Name	Firma
<b>Lösungen und Puffer</b>		
Paraformaldehyd (PFA)		Zentralapotheke Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Fluoreszenzfärbung DVS (Eindeckmedium für die Konservierung gefärbter Gewebeschnitte mit DAPI Farbstoff)	VECTASHIELD mounting medium for fluorescent with DAPI (H-1200)	VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)
Hämatoxylin Färbung (HQS)	Hematoxylin Quickstaining (H-3404)	VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)
<b>Geräte/ Materialien</b>		
Objektträgerboxen		Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Markierungsstift	ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen	VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMLB	Leica Microsystems (Wetzlar, Germany)
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Transparenter Nagellack Deckgläschen	Coverslips Menzel-Gläser	Thermo scientific, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Nach 14 Tagen statischer in-vitro Kultivierung in endotheliale Medium wurden die zellularisierten Polymervliese in einem Einbettmedium auf Stempeln senkrecht angeordnet und durch das Eintauchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80° Celsius. Für die Erstellung von Gefrierschnitten wurden die Gewebeblöcke auf -20° Celsius gebracht, mit einem Kryomikrotom 6µm dünne Schnitte angefertigt und diese auf adhäsive Glasobjekträger vorsichtig überführt. Diese Gefrierschnitte wurden bei -20° Celsius gelagert, bis sie für Färbungen weiter verwendet wurden. Die Fixierung der Polymerschnitte erfolgte durch Inkubation mit 2%igem Paraformaldehyd für 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließendem dreimaligen Waschen in gepufferter Salzlösung für fünf Minuten.

Zur Detektion vitaler Zellen wurde die *DAPI VECTASHIELD*-Färbung (DVS) durchgeführt, welche den Fluoreszenzfarbstoff DAPI<sup>15</sup> enthält. Diese Färbung markiert den Zellkern der Zellen durch Anlagerung an die Nukleinsäuren und beinhaltet zugleich das Eindeckmedium, sodass direkt nach der Farbaufträufelung ein Deckgläschen zum Schutz der Schnitte aufgelegt werden kann. Das Pipettieren des fluoreszierenden Farbstoffes erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht getrocknet und nach 24 Stunden mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die gefärbten Schnitte wurden bei Dunkelheit und 4° Celsius gelagert. Für die quantitative und qualitative Analyse wurde das Fluoreszenzmikroskop Leica DMLB mit verschiedenen Objektiven verwendet und mit dem Programm *Leica Application Suite* Fotografien angefertigt. Desweiteren wurden Zellkernfärbungen mit der *Hämatoxylin Quickstaining* Färbung (HQS) angefertigt, welche auch bei der immunhistochemischen Analyse benötigt wurde. Das detaillierte Protokoll der Hämatoxylinfärbung ist dem Anhang unter 7.1- VII. zu entnehmen.

---

<sup>15</sup> 4',6-Diamidin-2-phenylindol



### 2.4.3 Immunhistochemie

Tabelle 6: Materialien und Geräte Immunhistochemie

#### Immunhistochemie

(von „Materialien und Geräte allgemein“ abweichende Materialien)

Bezeichnung	Name	Firma
<b>Lösungen und Puffer</b>		
Ethanol 96%		Zentralapotheke Universitätsklinikum Rostock (Rostock, Deutschland)
Xylene		J.T.Baker® (Deventer, Netherlands)
Peroxidase Blocking Reagent		DAKO, Agilent (Santa Clara, USA)
Blocking Serum		VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)
NovaRed	ImmPACT NovaRED (VEC-SK-4805,)	VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)
Kit für das Färbeprotokoll mit Biotin-Avidin Detektionssystem	Vectastain Elite ABC-HRP-Kit (Peroxidase, Rabbit IgG) (VEC-PK-6101) Kit	VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)
Immunhistochemische Antikörper	rabbit anti-laminin 1+2 (ab7463), rabbit anti-integrin beta 1 (ab52971), rabbit anti-collagen IV (ab6586), rabbit anti-fibronectin (ab2413)	Abcam (Cambridge, USA)
Hämatoxylin Färbung	Hematoxylin Quickstaining (H-3404)	VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)
<b>Geräte/ Materialien</b>		
Rührplatte	MR3001K	Heidolph (Schwabach, Germany)
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Eindeckmedium für immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte	Pertex®	Medite GmbH (Burgdorf, Germany)

Für die immunhistochemischen Analysen der durch die HUVECs gebildeten Basalmembranproteine wurden zunächst Gefrierschnitte angefertigt (wie unter 2.4.2 beschrieben). Nach der Fixierung mit 2%igem PFA erfolgte die Antikörperfärbung zur Detektion der Basalmembranproteine Laminin-1+2, Integrin- $\beta$ 1, Collagen-IV und Fibronectin<sup>16</sup> mit primären Antikörpern (genaue Antikörperbezeichnung siehe Anhang 7.1-III.) unter der Verwendung des *VECTASTAIN Elite ABC-HRP-Kits* mit einem sekundären biotinylierten anti-rabbit Antikörper. Zur Visualisierung der Antikörperbindung wurde das *ImmPACT NovaRED Peroxidase* Substrat verwendet. Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz zeigt sich durch einen Primärantikörper, der an das gesuchte Antigen bindet. Dieser wiederum wird

<sup>16</sup> Hinweis: es werden die internationalisierten Bezeichnungen Fibronectin(-1) und Collagen(-IV) (aufgrund von Primer-Bezeichnungen) sowie die deutschen Schreibweisen Fibronectin und Kollagen synonym verwendet

vom biotinmarkierten Sekundärantikörper gebunden und löst eine Enzym-Substrat-Reaktion aus, sobald das Substrat mit Peroxidase hinzugefügt wird.

Nach Etablierungstests mit unterschiedlichen Fixierungen, Konzentrationen und Hintergrundblockierungen wurde das im Folgenden beschriebene Verfahren als optimale Vorgehensweise für zellularisierte Polymergewebeschnitte herausgearbeitet. Zunächst wurde zwischen zwei Gefrierschnitten auf einem Objektträger eine Trennlinie gezogen, um eine negative Kontrolle abzutrennen. Alle folgenden Schritte wurden, bis auf die Inkubation mit dem primären Antikörper, an beiden Hälften simultan durchgeführt. Mit dem *Peroxidase Blocking Reagent* wurde im nächsten Schritt die endogene Peroxidase für 10 Minuten geblockt. Nach einem Waschschrift (PBS, fünf Minuten) wurde Serum zur Blockierung weiterer Proteine für 20 Minuten auf die Schnitte pipettiert. Nach Entfernung des Serums durch Senkrechtstellung der Schnitte folgte die 30minütige Inkubation in feuchter Atmosphäre bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper beziehungsweise mit PBS für die Negativkontrollseite. Daraufhin folgte ein Waschschrift und die 30minütige Inkubationszeit mit dem verdünnten, sekundären biotinylierten Antikörper. Vor und nach der Inkubation mit dem *Vectastain Elite ABC-Kit* wurde erneut gewaschen, um im Anschluss die Expression der jeweiligen Basalmembranproteine mit dem *NovaRed Peroxidase* Substrat in 2-minütiger Inkubation zu visualisieren. Nach Spülung in Leitungswasser wurden die Schnitte für 15 Sekunden mit HQS inkubiert, um die Zellkerne anzufärben (zart blau). Nach Abspülen der Farbe wurden die Gewebeschnitte für die langfristige Fixierung in einer Alkoholreihe und Xylene entwässert sowie an letzter Stelle mit Eindeckmedium bedeckt. 24 Stunden nach der Eindeckung der Objektträger mit Deckgläschen wurden diese mit Nagellack rundherum luftdicht verschlossen.

Es folgte eine qualitative Untersuchung mit dem Lichtmikroskop in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung. Aufnahmen wurden mit der *Leica Application Suite* erstellt. Dabei wurde mit den negativen Kontrollen sowie mit nativen Kontrollen verglichen. Als native Kontrollen dienten Gewebeschnitte von Aorten- und Pulmonalklappen vom Schwein, welche freundlicherweise vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (Dummerstorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden.

### 2.4.4 Polymerasekettenreaktion

Tabelle 7: Materialien und Geräte qRT-PCR

#### Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

(von „Materialien und Geräte allgemein“ abweichende Materialien)

Bezeichnung	Name	Firma
<b>Lösungen und Puffer</b>		
RNA-Isolationsreagenz	QIAzol Lysis Reagent	Qiagen (Germantown, USA)
RNA Reinigungslösung	RNase Zap®	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Chloroform		Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2- Propanol		J.T.Baker® (Deventer, Netherlands)
Reverse Transkriptase-Kit	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
qRT-PCR Mastermix	TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Primer	TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<b>Geräte/ Materialien</b>		
Kleine Zentrifuge	Eppendorf 5417R Zentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
RT-PCR-Gerät	StepOnePlus® Real-Time PCR Systems; real-time PCR-Cycler	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermocycler	MJ Mini™ personal thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Spektrometer	Nanodrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Minizentrifuge	Galaxy Mini	VWR (Darmstadt, Deutschland)
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
PCR Tubes 0,2ml		Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Filterspitzen	0,5-20µl neutrale Biosphere® Filter Tips	Sarstedt AG+Co (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen, verschiedene Größen		Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, Deutschland)
PCR Reaktionsplatte mit Barcode und Deckfolie (0,1ml)	Applied Biosystems® MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Programm für qRT-PCR	StepOne™ Software v2.0	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

*Tabelle 8: qRT-PCR Primer*

Gen/Primer Abkürzung	Zielgen	TaqMan® Assay ID
LAMA1	Laminin- $\alpha$ 1	Hs00300550_m1
ITGB1	Integrin- $\beta$ 1 (Fibronectin-R)	Hs00559595_m1
FN1	Fibronectin-1	Hs00365052_m1
COL4a1	Collagen-IV- $\alpha$ 1	Hs00266237_m1

### *PCR Allgemein:*

Für die Untersuchung der Endothelialisierung, Zelladhäsion und der Basalmembranentwicklung der auf Polymeren kultivierten HUVECs wurde die Genexpression der Proteine Laminin- $\alpha$ 1, Integrin- $\beta$ 1, Fibronectin-1 und Collagen-IV mittels der qRT-PCR analysiert.

Die PCR wird im Allgemeinen zur Vervielfachung von bekannten Gensequenzen verwendet, was mit Hilfe der DNA-Polymerase erfolgt, die von kurzen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, zu den zu kopierenden Sequenzen geleitet wird [28]. Durch die Reverse Transkriptase ist es heutzutage möglich nicht nur DNA zu vervielfältigen, sondern auch RNA durch die Umschreibung in cDNA auf diese Weise zu analysieren. Die mRNA stellt das Bindeglied zwischen Genexpression und Proteinbiosynthese dar und kann somit repräsentativ für die Prozesse der Zelle untersucht werden. Die qRT-PCR hilft bei der Quantifizierung der Expression bestimmter Gene, indem die umgeschriebene RNA in Form von cDNA als Ausgangsnukleinsäure verwendet wird [68]. Grundbausteine für eine PCR sind eine thermostabile DNA-Polymerase wie die *Taq-DNA-Polymerase*<sup>17</sup>, eine Ausgangs-DNA, passende Oligonucleotidprimer, Puffer und Nucleotide. Während der PCR erfolgt die Auftrennung der Einzelstränge (Denaturierung), eine Hybridisierung der Oligonukleotidprimer (Annealing) und eine Verlängerung der Primer (Elongation). Ein durchlaufener Zyklus verdoppelt die Zahl der Ursprungs-DNA, ein zweiter Zyklus vervierfacht sie [68].

Unter den quantitativen Auswertungsmethoden zeigt sich die Echtzeit-PCR als besonders erfolgreich, da sie früher bestehende post-PCR Prozesszeiten und Kontaminationen vermeiden kann und reproduzierbar sowie automatisierbar ist. Beim Taqman-Prinzip werden hybridisierte Sonden (Oligonucleotide) verwendet, die sequenzspezifisch an gegenüberliegenden Enden der Einzelstränge binden und mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden [69]. Während der

---

<sup>17</sup> klassische PCR-Polymerase, aus Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert, Temperaturoptimum bei ca. 70° Celsius [68]

Elongationsphase, bei der Synthese des Gegenstranges, kann über ein Fluoreszenzsignal die Quantifizierung der Amplifikation gemessen werden. Eine höhere DNA-Synthese erhöht die Signalstärke des fluoreszierenden Lichtes [68]. Die meisten PCR Amplifikationen erreichen ein Plateau der Fluoreszenz, wenn die Zykluszahl steigt. Der *Amplification plot* des Echtzeit-PCR Gerätes stellt die exponentielle Phase der Vervielfältigung dar. Ein Schwellenwert, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrund abhebt, wird als Richtwert festgelegt, da die Vervielfältigung zu diesem Zeitpunkt noch exponentiell ist. Die Zykluszahl, bei welcher der Schwellenwert erstmalig überschritten wird, wird *cycle threshold* ( $C_T$ ) genannt [70]. Die Aussage über die mRNA-Menge im Ausgangsmaterial zeigt sich dennoch nur als Mindestmenge, da die cDNA-Synthese höchst unterschiedlich verlaufen kann. Daher wird ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen<sup>18</sup> als endogene Kontrolle gewählt, dessen Expression als konstant angesehen wird [68][71]. In den durchgeführten Experimenten wurde cDNA von humaner Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) serienmäßig für alle Proben und alle Primer als Referenzgen verwendet.

### *Methode: RNA Isolation:*

Nach 14 Tagen statischer in-vitro Kultur wurden die endothelialisierten Polymergewebeproben mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in Kryotubes eingefroren und bei -80° Celsius gelagert. Es wurden alle Schritte unter nukleasefreien Arbeitsbedingungen durchgeführt, um eine Zerstörung der limitierten RNA zu vermeiden. Um eine ausreichende RNA-Gesamtmenge zu gewährleisten, wurden die vorhandenen Proben einer Gruppe gepoolt. Der erste Schritt der RNA-Isolation beinhaltet das Lösen der Zellen von der Polymeroberfläche und die Homogenisierung des Gewebes, um die RNA aus dem Zellverbund zu lösen. Dafür wurde zunächst 1 ml Isolationsreagenz auf die Proben gegeben und nach mehrmaligem Pipettieren für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 0,2ml Chloroform, kräftigem Schütteln und anschließender Zentrifugation (12.000xg, 4° Celsius, 15 Minuten) erfolgte im nächsten Schritt die Phasentrennung in RNA, DNA, Proteine und Lipide. Die obere wässrige Phase mit der RNA wurde für den nächsten Schritt in ein frisches 1,5ml Röhrchen überführt. Um die RNA von Salzen und Proteinen zu reinigen wurde 0,5ml 2-Propanol auf die wässrige Phase gegeben, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (12.000xg, 4° Celsius, 10 Minuten). Die RNA blieb nun als gelartiges Pellet zurück, welches mithilfe 75%igem Ethanol und eines weiteren Zentrifugationschritt (7.600xg, 4° Celsius für 5 Minuten) gewaschen wurde. Für die anschließende Messung der RNA-Konzentration mit dem *NanoDrop1000* wurde das entstandene RNA-Pellet in 30µl nukleasefreiem Wasser gelöst.

---

<sup>18</sup> engl. housekeeping gene

### *Methode: Messung RNA-Konzentration:*

Der *NanoDrop1000* misst als Spektrometer über die optische Dichte (OD) die Konzentration und die Reinheit der extrahierten RNA (in ng/μl) unter der Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Eine Verunreinigung der RNA durch Proteine, Phenole oder andere Kontaminationen wird durch eine Ratio  $OD_{260}/OD_{280}$  unter 2,0 angezeigt. RNA absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 260nm, weitere mögliche Verunreinigungsstoffe der Isolation liegen im Absorptionsbereich von 230nm. Die Ratio  $OD_{260}/OD_{230}$  bietet daher eine zweite Garantie für die Reinheit der Isolation. Bei Ratio  $OD_{260}/OD_{230}$  -Werten, die weit unter eins liegen muss eine Kontamination bedacht werden [72]. Für die hier beschriebenen Experimente wurden unter Beachtung dieser Maßgaben nur reine Proben verwendet.

### *Methode: cDNA-Synthese:*

Für die Synthese von cDNA wurde das Prinzip der reversen Transkriptase mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* der Firma Applied Biosystems (siehe Anhang 7.1.-IV) verwendet. Für eine leichtere Handhabung wurde der benötigte Mastermix (siehe Anhang 7.1.-V) vorbereitet. Von der reinen RNA wurde von jeder Probe 2μg in cDNA umgeschrieben, was bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen zu einer individuellen Anpassung der nukleasefreien Wassermenge für jede Probe führte, um zusammen mit dem Mastermix 20μl Gesamtreaktionsvolumen zu erreichen. Nach Synthese der cDNA durch den *ThermoCycler* wurde die cDNA mit der Konzentration von 2μg/20μl bei -20° Celsius gelagert.

### *Methode: qRT-PCR und Auswertung:*

Die qRT-PCR verwendet die isolierte RNA in Form von cDNA um die Genexpression von Zellen darzustellen. Hierfür wurden im ersten Versuchsdurchlauf Triplikate und im zweiten Versuchsdurchlauf Duplikate in die 96-Wellplatte mit humaner GAPDH als endogene Kontrolle sowie einer Negativkontrolle pipettiert. Bei der Durchführung wurden für jede Probe jeweils die endogene Kontrolle und das gesuchte Zielgen untersucht (siehe Tabelle 8).

Nach Abschluss des Pipettierens wurde die 96er qRT-PCR-Platte auf Luftblasen in den Wells kontrolliert, mit einer Folie verschlossen und die Komponenten bei 300xg 2 Minuten zentrifugiert. Die Amplifikation und Detektion wurde durch das *StepOnePlus™ Real-Time PCR-System* durchgeführt.

Die Software des qRT-PCR-Geräts misst die Zykluszahl für jede Reaktion, bei welcher das Fluoreszenzsignal eine deutliche Abhebung vom Hintergrundsignal zeigt. Die  $C_T$  -Werte der Zielgene wurden gewählt, um die Präsenz von spezifischer RNA nachzuweisen, wobei niedrigere  $C_T$ -Werte eine stärkere Genexpression präsentieren.

Die Zielgene wurden gegen den  $C_T$  -Wert des humanen Referenzgens (GAPDH) normalisiert und als  $\Delta C_T$  in den Diagrammen dargestellt (Formel:  $\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen (Mittelwert)}} - C_{T \text{ GAPDH}}$ ) [73].

### 2.4.5 Spezifischer Polymerasekettenreaktionsarray für Zellverbindungen

Die isolierte und umgeschriebene RNA wurde zusätzlich mithilfe des humanen *Cell Junction Pathway Finder RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array* (PAHS 213-Z) der Firma Qiagen für die endothelialisierten Polymergewebe PA-6, L-PA-6 und PLLA von Biologin Anita Tölk aus dem FKGO analysiert. Dabei wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen [74]. Dieser PCR-Array dient der spezifischen Untersuchung von 84 Genen für Zellverbindungen (siehe Anhang 7.1-VIII). Dazu zählen die Fokalen Kontakte, Tight Junctions, Gap Junctions, Adhäsionsproteine, Desmosomen und Hemidesmosomen. Die Amplifikation und Auswertung erfolgte nach den oben beschriebenen Methoden der Polymerasekettenreaktion mit abweichendem Referenzgen HPRT1<sup>19</sup>.  $\Delta C_T$ -Werte der ausgewählten Gene wurden durch die Formel  $C_{T \text{ Zielgen (mittelwert)}} - C_{T \text{ HPRT1}}$  berechnet. Die  $2^{-\Delta C_T}$  Methode wurde verwendet, um die Level der Zielgene darzustellen. Dabei wurden nur Werte über 1 für die Betrachtung und Diagrammerstellung heran gezogen, um eine wesentliche Expression spezifischer RNA darzustellen.

## 2.5 Statistische Analyse

Für die Ergebnisanalyse wurde eine fokussierte Auswahl der umfangreichen Materialsammlung getroffen. Die Analyse der mechanischen Untersuchungsergebnisse erfolgte im IBMT der Rostocker Universitätsmedizin. Aus den Zugversuchen wurden von der Probenform unabhängige Kurven, sogenannte Spannungs-Dehnungs-Diagramme erstellt. Die Kurven der einzelnen Materialien wurden mit einer Probenanzahl von  $n=5$  erhoben und jeweils mit zugehörigem Mittelwert und Standardfehler aufgezeichnet.

Für die Analyse der beschreibenden Charakterisierung von Endothelialisierung, Basalmembran- und Zellverbindungsentwicklung der zellularisierten Polymergewebe wurden überwiegend qualitative Methoden in Bildform verwendet. Soweit möglich wurden nicht-statistische Vergleiche zur Darstellung von möglichen Einflussfaktoren angeführt. Die qRT-PCR-Ergebnisse wurden aufgrund der limitierten RNA-Menge (pro Versuch und Material  $n=1$ ) im Sinne einer Tendenz in Balken- und Tortendiagrammen dargestellt.

---

<sup>19</sup> Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (= housekeeping gene)

Für die histologischen Untersuchungen wurden pro Material und Versuch multiple Mikroskopaufnahmen ausgewertet. Dabei wurden pro Aufnahme die Zellen gezählt und die Strecken der Polymervliesoberflächen mit dem Programm ImageJ (Open Source) vermessen und anschließend auf Millimeter normiert. Die Werte wurden in Zellen pro Fläche (mit der Einheit  $\text{mm}^2$ ) umgerechnet. Die quantitativen Ergebnisse wurden zur besseren Vergleichbarkeit als Mittelwerte (MW) mit der zugehörigen Standardabweichung (STABW) mit einer Nachkommastelle dargestellt. Die n-Zahlen entsprechen der Anzahl der ausgewerteten Mikroskopaufnahmen, welche methodisch bedingt variiert.

Die graphische Darstellung der Parameter in dieser Arbeit erfolgte in Tabellen, sowie in Balken-, und Tortendiagrammen. Zum Errechnen der Daten und zum Erstellen der Graphiken wurde Microsoft Excel verwendet.



### 3. Ergebnisse

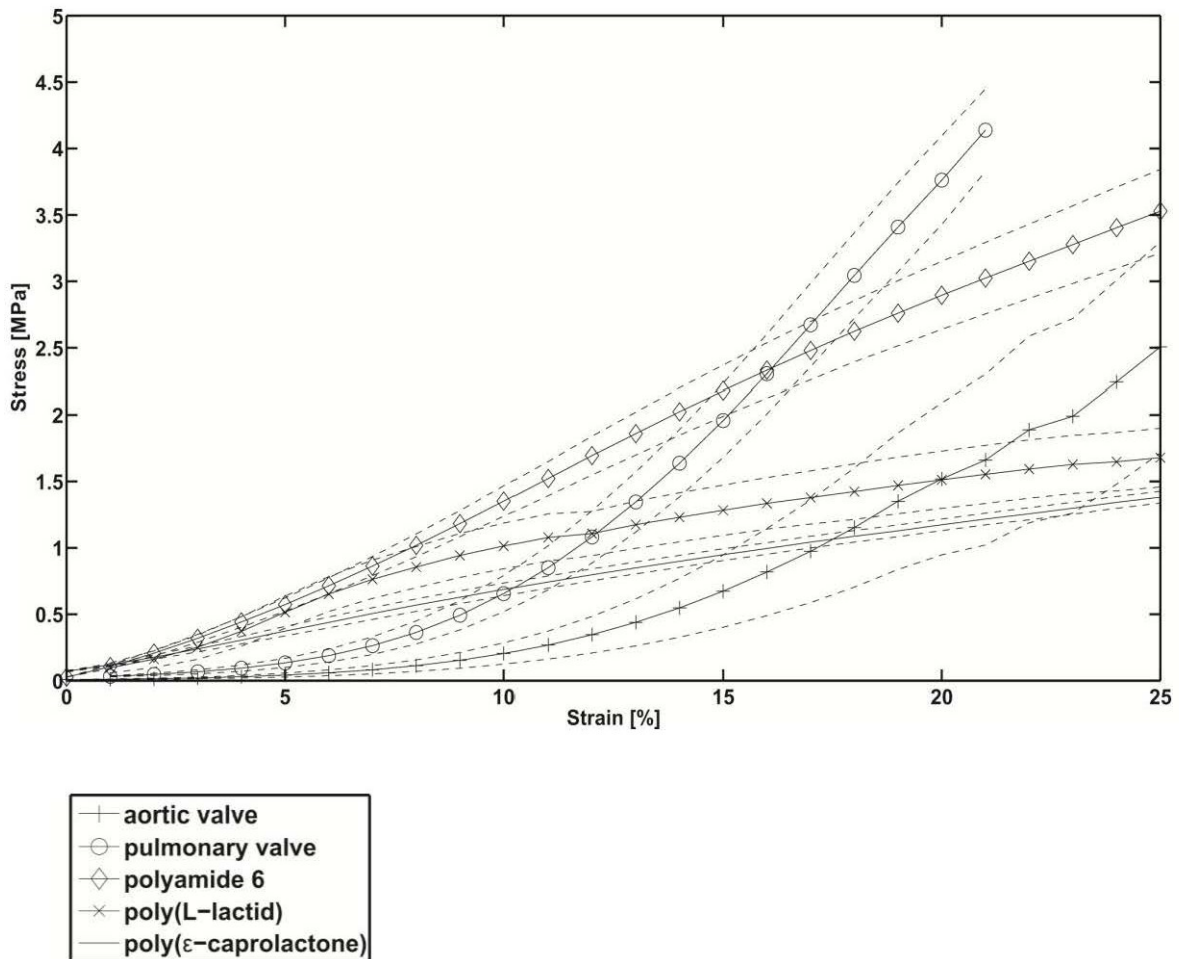
#### 3.1 Mechanische Eigenschaften der Grundgerüstmaterialien

Im Warnemünder IBMT wurden durch Dipl. Physikerin Daniela Arbeiter Polymervliese und natives Klappengewebe vom Schwein vor und nach der Zellularisierung in uniaxialen Zugbelastungstests zur Feststellung der mechanischen Eigenschaften der Materialien untersucht. In den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen ist die Dehnung in Prozent angegeben, die Spannung in MPa (Abbildung 7). Die Werte der nativen Gewebestreifen aus Aorten- und Pulmonalklappe des Schweins zeigen einen annähernd exponentiellen Kurvenverlauf in den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen. Diese Ausrichtung wird aufgrund des nativen Gewebsursprunges als ideal für Herzklappengerüste betrachtet und ist bei den getesteten künstlichen Materialien nicht ausreichend zu finden. Polymerstreifen aus PLLA und PCL ohne Zellbesiedelung dehnten sich bei niedriger Zugspannung bereits eine stark. In den Versuchen kam heraus, dass die Präparate bei Dehnung von über 20% zu einer intensiven und irreversiblen Verlängerung neigten, ohne dass eine adäquate Zugspannung erreicht wurde. Deutlich zu erkennen ist die kaum mehr weiter ansteigende Kurve von PLLA bei Dehnung über 20%. Die Kurve des nicht zellularisierten PA-6 zeigt durch den stärkeren Anstieg der Zugspannung ohne Erreichen eines Plateaus unter den untersuchten Proben die größte Ähnlichkeit zu den Kurven der nativen Vergleichsproben. Während die nativen Gewebe einen Punkt erreichten, bei dem sie rissen, trat dies bei den künstlichen Materialien im getesteten Bereich bis 30% Dehnung nicht auf. Diese passten sich der Dehnung an, indem sie sich irreversibel verlängerten. Die Aortenklappe riss bei ca. 26% Dehnung, die Pulmonalklappe bereits bei 21% Dehnung.

Die Diagramme demonstrieren eine suffiziente uniaxiale Belastbarkeit von PA-6 mit steigender Zugspannung. Das elektronisch gesponnene PCL hingegen zeigte sich in den Spannungs-Dehnungs-Kurven als ein enorm dehnbares Material und wurde aufgrund dieser Eigenschaft innerhalb der experimentellen Phase bei der Fokussierung auf spezialisierte Untersuchungen ausgeschlossen. Der Vergleich des erreichten Dehnungslevels bei eingesetzten 2 MPa zeigt diesen Unterschied quantitativ. Die Aortenklappe zeigt bei 2MPa eine Dehnbarkeit von 23%. Die Pulmonalklappe und PA-6 bewegen sich in Bereichen um die 15%. Die kurven der Materialien PCL und PLLA erreichten unter getesteten Bedingungen bis 25% Dehnung keine Spannung von 2 MPa.

Betrachtet man die Kurven zur maximal erreichbaren Spannung im untersuchten Ausmaß bis 25% Dehnung, erhält man quantitative Unterschiede in der Festigkeit der Materialien. Die Pulmonalklappe erreichte ein hohes Spannungslevel bis 4,15 MPa, gefolgt vom Polymer PA-6. Die

Diagramme zeigen eine höhere uniaxiale Steifigkeit von Pulmonalklappen im Vergleich mit Aortenklappen in den Zugbelastungstests.

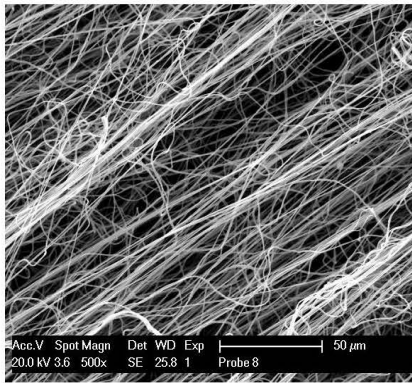


**Abbildung 7: Mechanische Eigenschaften von Materialien für valvuläres Tissue Engineering (Tag0)**

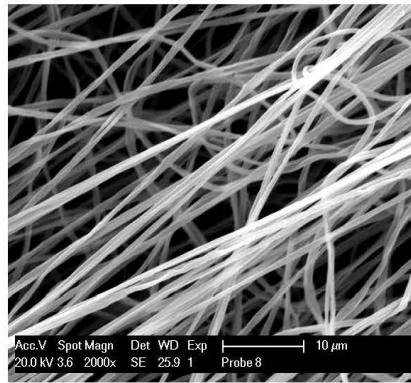
Spannungs-Dehnungs-Diagramme der Polymervliese Polyamid-6 (PA-6), Poly-L-Lactid (PLLA) und Poly-E-Caprolactone (PCL) vor der Zellularisierung (Tag0), Aorten- und Pulmonalklappe vom Schwein als Kontrolle [inklusive Mittelwert +/- Standardfehler]; *Stress [MPa]*= engl. Spannung, *Strain[%]*= engl. Dehnung; Graph erstellt durch D. Arbeiter, IBMT Rostock

#### **3.2 Nanostruktur der Polymervliese**

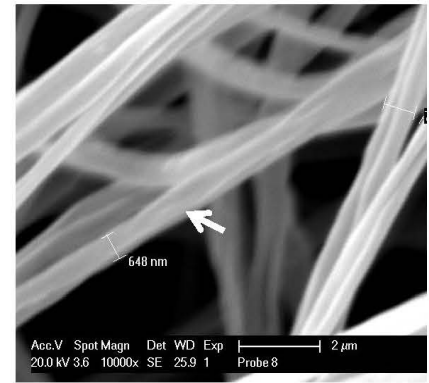
Um die Nanostruktur des Grundgerüstmaterials kennen zu lernen, wurden Aufnahmen mit dem REM in 500facher, 2000facher und 10000facher Vergrößerung angefertigt (Abbildung 8). Hierbei wurde die oberflächliche Draufsicht auf die Polymervliese gewählt. Die Aufnahmen bestätigten eine gewünschte zufällige Faseranordnung der elektronisch gesponnenen Nanofasern aus den Polymeren mit substratspezifischer Faserdicke. Die Durchmesser der Fasern lagen zwischen 400-700nm beim PLLA, 200-300nm beim PA-6 sowie 150nm – 2000nm (aufgrund von Perlbildung) beim PCL. Auffallend ist die in regelmäßigen Abständen entstandene Kugelbildung beim PCL mit Perlgrößen zwischen 1000 und 4000 Nanometern. Die Aufnahmen aller drei Grundsubstrate der Untersuchungen zeigten, wie im experimentellen Aufbau gewünscht, keine relevante Porenbildung.



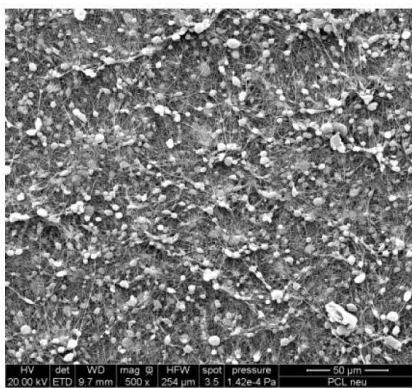
**A:** PLLA, 500fache Vergrößerung



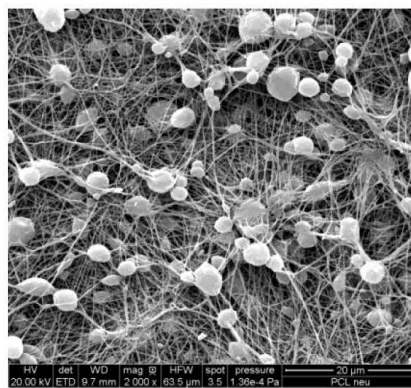
**B:** PLLA, 2000fache Vergrößerung



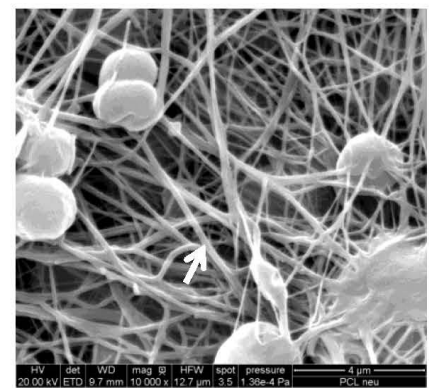
**C:** PLLA, 10000fache Vergrößerung, Pfeil:648nm dicke Faser



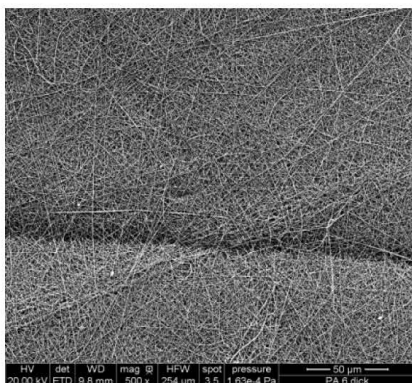
**D:** PCL, 500fache Vergrößerung



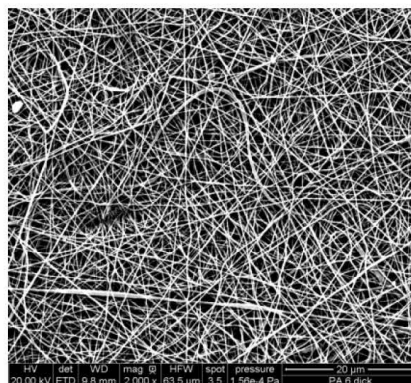
**E:** PCL, 2000fache Vergrößerung



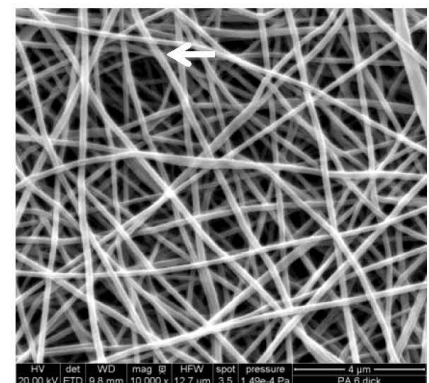
**F:** PCL, 10000fache Vergrößerung, Pfeil: 189,3nm dicke Faser



**G:** PA-6, 500fache Vergrößerung



**H:** PA-6, 2000fache Vergrößerung



**I:** PA-6, 10000fache Vergrößerung, Pfeil: 221,9nm dicke Faser

**Abbildung 8: Nanofasern der Vliese mit dem Rasterelektronenmikroskop vor Zellularisierung (Tag0)**

in 500facher, 2000facher und 10000facher Vergrößerung; **A-C:** Polymerfasern aus PLLA, **D-F:** Polymerfasern aus PCL mit Perlbildung, **G-I:** Polymerfasern aus PA-6

#### **3.3 Fokus I: Zellularisierungsergebnisse der Polymervliese**

Zur Überprüfung der Adhäsionseigenschaften der Endothelzell-Fibrin-Komposition (EC-Fib) und der Zellvitalität nach erfolgtem Sprühprozess wurden Proben der Polymervliese PLLA, PCL und PA-6 24 Stunden nach der Zellularisierung und Kultivierung auf ihre Mechanik, die Oberflächenstruktur, das Zellüberleben und die Basalmembranentwicklung mit verschiedenen Methoden untersucht. Dabei ergab sich eine überwiegend gleichmäßige Besiedelung der Polymere mit HUVECs auf allen Präparaten.

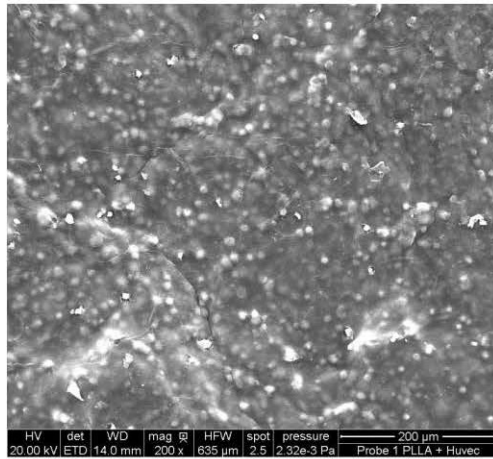
Die zellularisierten Polymervliese wurden weiterhin für 14 Tage in endotheliale Medium bei 37° Celsius kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt und die Kultur auf eventuelle Kontaminationen überprüft. Diese Langzeitkultivierung wurde am 14. Tag nach Sprühbesiedelung gestoppt und die Proben für diverse Untersuchungen fixiert.

##### **3.3.1 Endothelialisierung nach 24 Stunden Kultivierung**

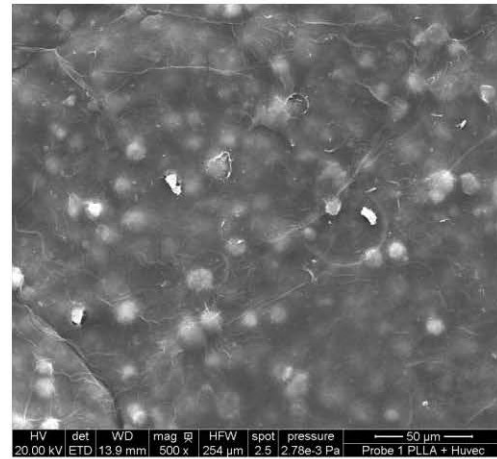
###### *Rasterelektronenmikroskopie:*

Zur Qualitätskontrolle der Sprühmethode wurden von den zellularisierten Polymervliesen PLLA, PCL und PA-6 rasterelektronenmikroskopische Bilder in 200- und 1000facher Vergrößerung in oberflächlicher Draufsicht angefertigt (Abbildung 9). Einen Tag nach erfolgter Zellularisierung der Polymervliese mit Endothelzellen und Fibrin und nachfolgender Kultivierung zeigte sich eine komplette Bedeckung aller Vliese mit Zellen und Fibrin. Die Fibrindecke stellte sich glatt und homogen dar mit durchscheinenden Zellkörpern. Deutlich erkennbar ist auf den Aufnahmen nach 24 Stunden die abgerundete Zellstruktur der Zellen bei noch partiell ausgereifter Zelladhäsion.

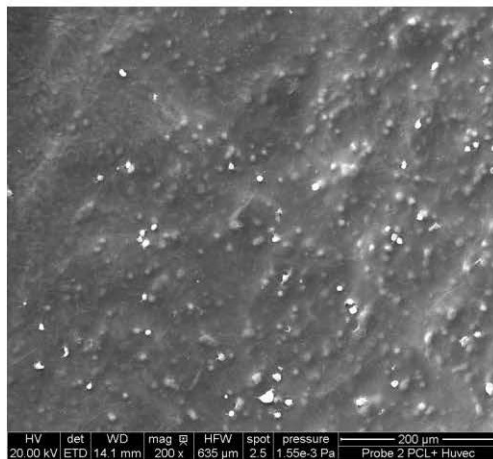
Auf weiteren Aufnahmen ist an methodenbedingt zerstörten Stellen sowie auf vereinzelten Schrägaufnahmen der Vliesschnittstellen deutlich die kombinierte Struktur aus Nanofasern und einer Decke aus Zellen und Fibrin zu sehen (zur Veranschaulichung in Abbildung 10 für PLLA und PA-6 dargestellt).



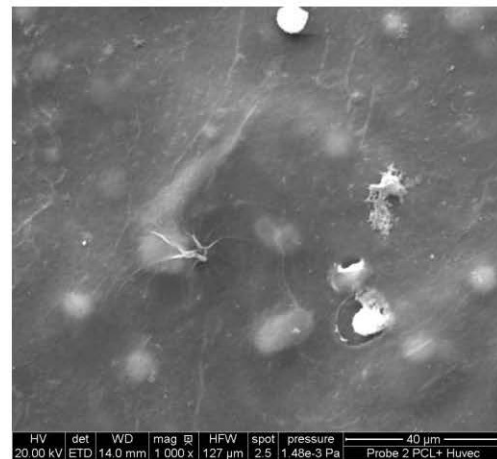
**A:** PLLA + EC-Fib nach 24h, 200fache Vergrößerung



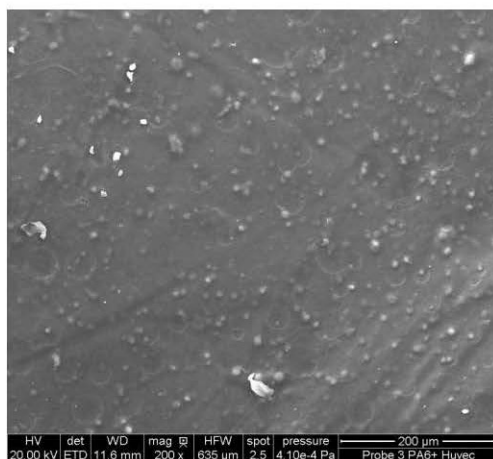
**B:** PLLA + EC-Fib nach 24h, 500fache Vergrößerung



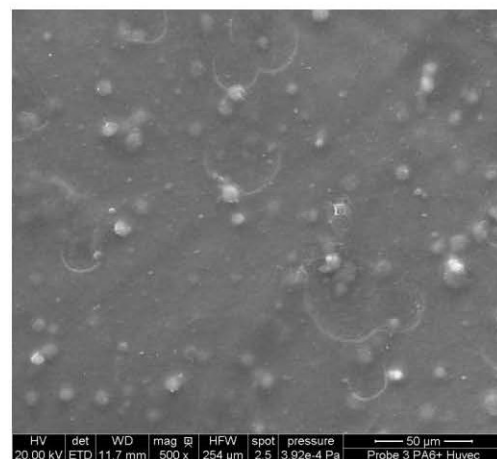
**C:** PCL + EC-Fib nach 24h, 200fache Vergrößerung



**D:** PCL + EC-Fib nach 24h, 1000fache Vergrößerung



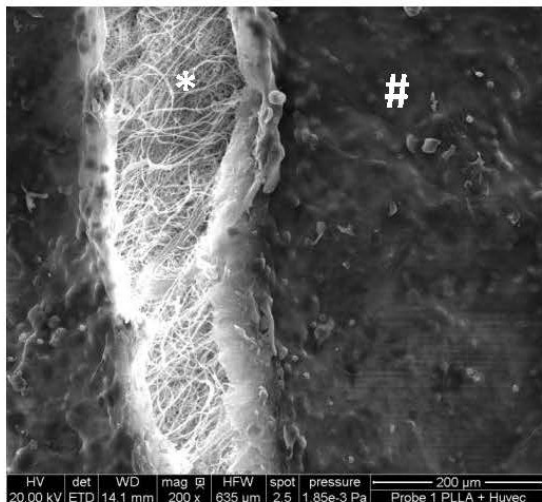
**E:** PA-6 + EC-Fib nach 24h, 200fache Vergrößerung



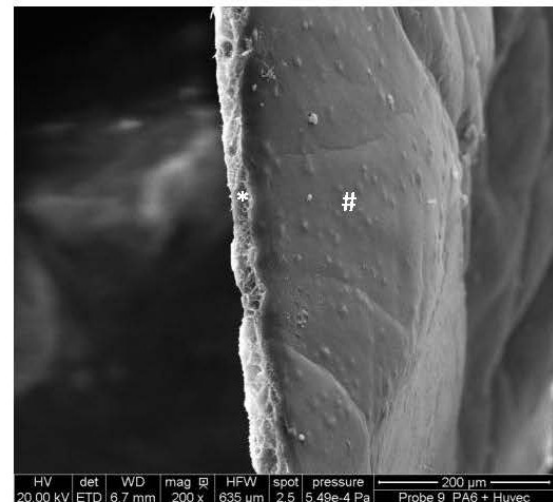
**F:** PA-6 + EC-Fib nach 24h, 500fache Vergrößerung

**Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen nach Zellularisierung (Tag1)**

Aufnahmen 24 Stunden nach Zellularisierung von Polymervliesen und HUVECs, in 200-, 500- und 1000facher Vergrößerung; **A+B:** zellularisiertes PLLA, **C+D:** zellularisiertes PCL, **E+F:** zellularisiertes PA-6



**A:** PLLA + EC-Fib, 24h nach Zellularisierung, 200fache Vergrößerung, Polymerfasern (\*) sind hier gut durch die methodenbedingt aufgebrochene Zell-Fibrinschicht (#) sichtbar



**B:** Faserstruktur (\*) und Endothelialisierung (#) auf PA-6 + EC-Fib, 24h nach Zellularisierung, 200fache Vergrößerung

#### Abbildung 10: Darstellung von Faserstruktur und Zellularisierung (Tag1)

REM-Aufnahmen 24 Stunden nach Zellularisierung von Polymervliesen mit HUVECs, in 200facher Vergrößerung;

**A:** zellularisiertes PLLA, **B:** zellularisiertes PA-6

#### Zelldichte:

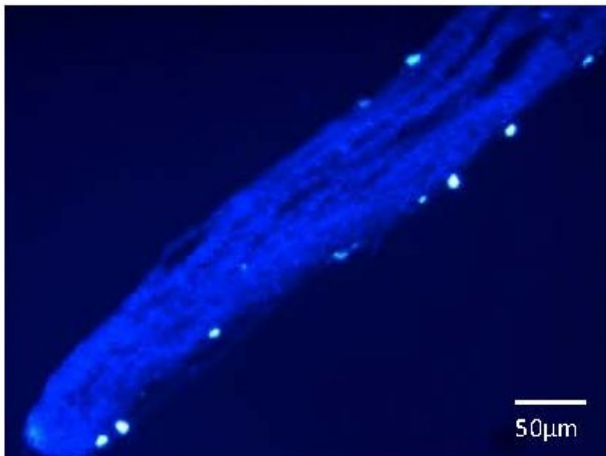
Um den Sprühprozess und die Zellvitalität 24 Stunden nach Versuchsstart zu überprüfen, wurden histologische Querschnitte und Färbungen der zellularisierten Polymervliese durchgeführt. Im Fluoreszenzmikroskop wurden Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung angefertigt (Abbildung 11). Die mit Hilfe von histologischen Bildern ermittelte durchschnittliche Zelldichte betrug 24 Stunden nach gesprühter Zellularisierung mit EC-Fib auf den Oberflächen der Polymervliese zwischen 188 und 545 Zellen/mm<sup>2</sup> (Tabelle 9). Die ermittelte Zelldichte aus der DVS-Färbung wurde aufgrund von möglicher Überlagerung durch die Eigenfluoreszenz der Polymere mit einer histologischen Zellkernfärbung (HQS) mit vergleichbarem Ergebnis überprüft. Auf dem Substrat PLLA fand sich 24 Stunden nach Zellularisierung die größte Zelldichte, gefolgt von PCL und PA-6. In den Querschnitten zeigte sich eine unregelmäßige Verteilung der Zellen auf der Substratoberfläche mit vereinzelt Zellansammlungen und Endothelzelllücken und eine klar erkennbare Vitalität und Unversehrtheit der Zellen (Abbildung 11). Das Substrat PA-6 stach während der Analysen durch eine ausgeprägte Eigenfluoreszenz unter den anderen Materialien hervor, welche jedoch eine Abgrenzung der Zellen vom Polymer nach Optimierung der Färbemethode zuließ.



**A:** PLLA + EC-Fib, 24h, DVS, 200fache Vergrößerung



**B:** PCL + EC-Fib, 24h, DVS, 200fache Vergrößerung



**C:** PA-6 + EC-Fib, 24h, DVS, 200fache Vergrößerung

**Abbildung 11: Histologie nach Zellularisierung (Tag1)**

Aufnahmen 24 Stunden nach Zellularisierung, 200fache Vergrößerung, Zellkernfärbung der HUVECs mit DAPI Vectashield, **A:** zellularisiertes PLLA, **B:** zellularisiertes PCL, **C:** zellularisiertes PA-6 (mit erkennbarer Eigenfluoreszenz)



*Tabelle 9: Zelldichte der HUVECs 24 Stunden nach Zellularisierung auf PLLA, PCL und PA-6*

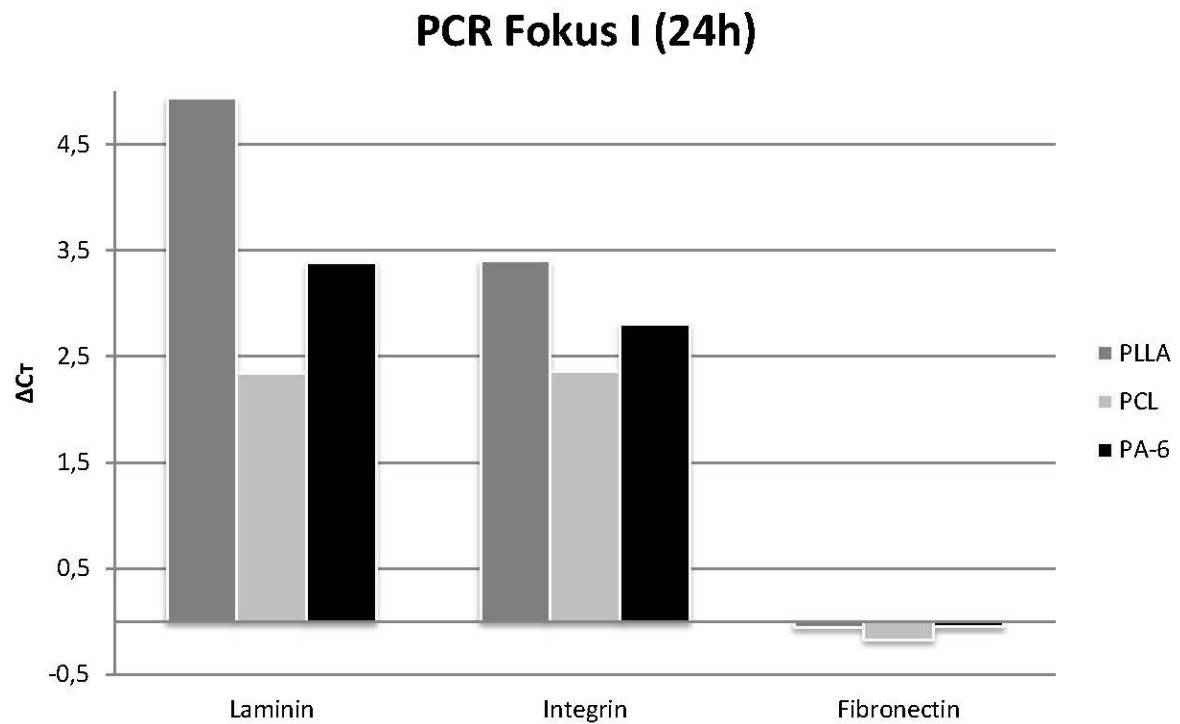
Erläuterung: Zellkernfärbungen HQS und DVS im Vergleich; Zelldichte= Zellzahl pro Fläche in  $n/mm^2$ ; n= Anzahl der ausgewerteten Mikroskopaufnahmen

		<b>HQS: Zellzahl/<math>mm^2</math></b>	<b>DVS: Zellzahl/<math>mm^2</math></b>	<b>[(HQS+DVS)/2]: Durchschnittliche Zellzahl/<math>mm^2</math></b>
<b>PLLA</b>	MW STABW n	463,6 342,4 30	627,7 581,3 18	<b>545,6</b> 461,9
<b>PCL</b>	MW STABW n	580,5 268,9 28	665,4 602,5 14	<b>622,9</b> 435,7
<b>PA6</b>	MW STABW n	253,6 195,6 19	122,5 76,4 19	<b>188,0</b> 136,0

#### 3.3.2 Basalmembranentwicklung nach 24 Stunden Kultivierung

##### *Genexpression:*

Zur Überprüfung der Aktivität der Endothelzellen 24 Stunden nach der Zellularisierung wurden die HUVECs auf den Polymeren PLLA, PCL und PA-6 mit der qRT-PCR auf die Genexpression der Basalmembranproteine Laminin- $\alpha$ 1, Integrin- $\beta$ 1 und Fibronectin-1 untersucht. Nach Normalisierung gegen das Referenzgen GAPDH wurden die  $\Delta C_T$ -Werte der Proben analysiert. Bei der Analyse ist zu beachten, dass sich die  $C_T$ -Werte zur Genexpression invers verhalten, was bedeutet, dass niedrige  $C_T$ -Werte eine vermehrte Synthese der Proteine darstellen (Abbildung 12). Hierbei zeigte sich eine verstärkte Genexpression für das Protein Fibronectin-1 sowie eine moderate Genexpression von Integrin und Laminin auf allen Substraten. Es ergaben sich insgesamt wenige Unterschiede zwischen den einzelnen Grundgerüstsubstraten bei der Genexpression der Zellen nach 24 Stunden Kultivierung. Die tendenziell stärkste Synthese aller drei Basalmembranproteine zeigte sich bei den auf PCL kultivierten HUVECs. Zusammenfassend ließ sich eine vorhandene Vitalität und funktionelle Aktivität der Endothelzellen auf allen Polymervliesen 24 Stunden nach Zellularisierung erkennen.

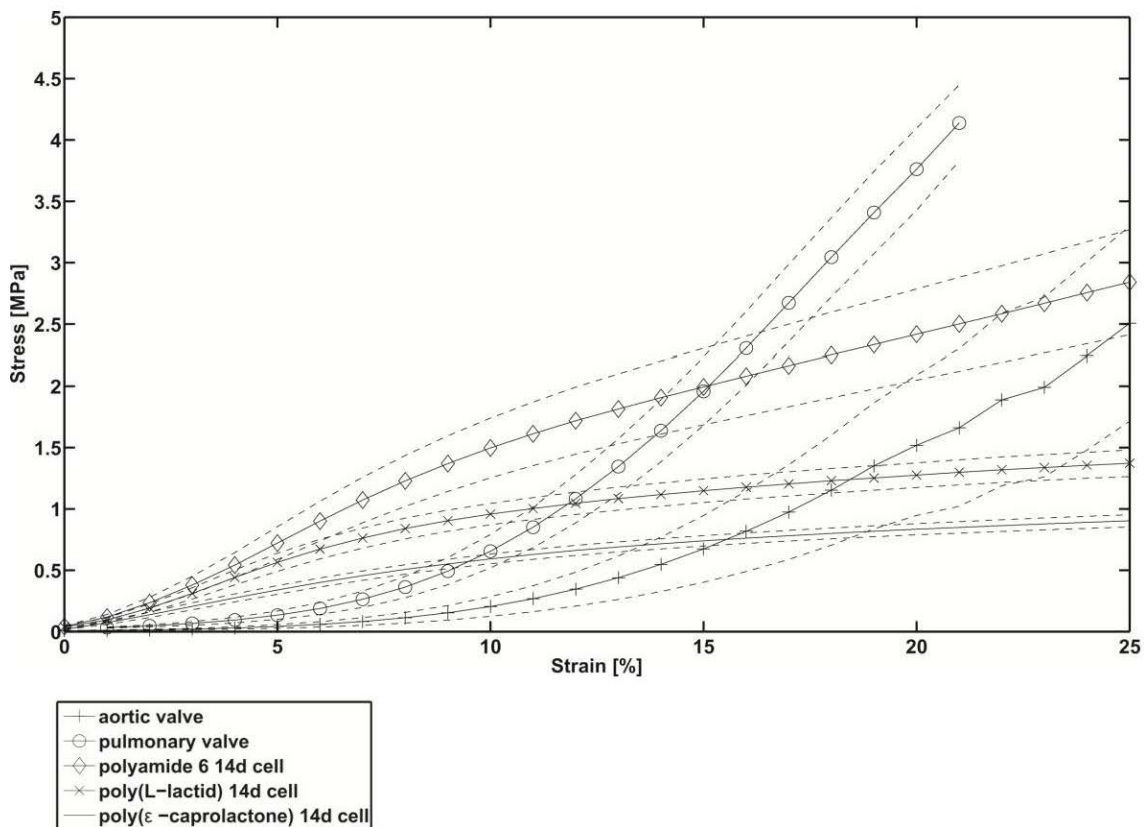


**Abbildung 12: qRT-PCR nach Zellularisierung (Tag1)**

qRT-PCR-Daten der Endothelzellen 24 Stunden nach Zellularisierung,  $\Delta C_T$  Graph mit den Polymersubstraten PLLA, PCL und PA-6, Genexpression der HUVECs für die Proteine Laminin- $\alpha 1$ , Integrin- $\beta 1$  und Fibronectin-1

#### 3.3.3 Mechanische Eigenschaften der Vliese nach 14 Tagen Kultivierung

Die Spannungs-Dehnungs-Kurven aller zellularisierten Substrate zeigten nach 14tägiger Zellularisierung und in-vitro Kultivierung der Polymervliese mit HUVECs eine moderate Verringerung der uniaxialen Gewebesteifigkeit verglichen mit den Proben ohne Zellen. Die erforderlichen Spannungshöhen bei zellularisierten Geweben nach 14tägiger Kultivierung für das Erreichen der gleichen Dehnung waren niedriger als bei den nicht behandelten Polymerfolien. Das Substrat PCL mit Zellbesiedelung markiert mit 0,9MPa den unteren Bereich der maximal erreichbaren Spannung im untersuchten Ausmaß bis 25% Dehnung. Kurven von nativen Aorten- und Pulmonalklappen wurden als Vergleichsgruppe ohne Kultivierung bei den Untersuchungen herangezogen (Abbildung13).



**Abbildung 13: Mechanische Eigenschaften der Materialien nach der Zellularisierung (Tag14)**

Spannungs-Dehnungs-Diagramme der zellularisierten Polymervliese Polyamid-6 (PA-6), Poly-L-Lactid (PLLA) und Poly-E-Caprolactone (PCL)), 14 Tage nach Zellularisierung mit HUVECs, Aorten- und Pulmonalklappe vom Schwein als Kontrolle [inklusive Mittelwert +/- Standardfehler]; *Stress [MPa]*= engl. Spannung, *Strain[%]*= engl. Dehnung; Graph erstellt durch D. Arbeiter, IBMT Rostock

### 3.3.4 Endothelialisierung nach 14 Tagen Kultivierung

#### *Zelldichte:*

Die untersuchten Polymersubstrate PLLA, PCL und PA-6 zeigten sich 14 Tage nach Zellularisierung als nicht toxische Oberflächen für die Adhäsion von Endothelzellen mit einer vitalen Endothelialisierung. Das Wachstum der Zellen stellte sich in den histologischen Querschnitten bei 200facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop überwiegend linear entlang der Oberflächen dar (Abbildung 14). Die Zellzahlen nach 14tägiger Kultivierung der Endothelzellen, untersucht mit der HQS-Färbung und der DVS-Färbung, zeigten eine suffiziente endotheliale Bedeckung mit adäquaten Zelldichten. Die ermittelte durchschnittliche Zelldichte betrug 14 Tage nach gesprühter Zellularisierung mit EC-Fib auf den Oberflächen der Polymervliese zwischen 300 und 525 Zellen pro  $\text{mm}^2$  (Tabelle 10). Stellenweise wurde eine dichte, physiologische Endothelzellschicht erkennbar, teilweise befanden sich jedoch auch nach 14 Tagen Kultivierung noch Unterbrechungen in der oberflächlichen Zellschicht. Im Vergleich mit den Zahlen 24 Stunden nach Zellularisierung zeigte sich die Zelldichte der Endothelschicht 14 Tage nach Kultivierung stabil bis moderat angestiegen und bei langstreckiger qualitativer Analyse der Oberflächen mit größerer Regelmäßigkeit in der Zellverteilung. Erkennbare endotheliale einschichtige Lagen bedeckten alle drei Polymersubstrate. Ein Einwachsen der HUVECs in die Gewebe konnte nicht beobachtet werden. Auffällig in den Aufnahmen stellt sich erneut die Eigenfluoreszenz von PA-6 im Vergleich mit den nicht-fluoreszierenden Materialien PLLA und PCL dar.

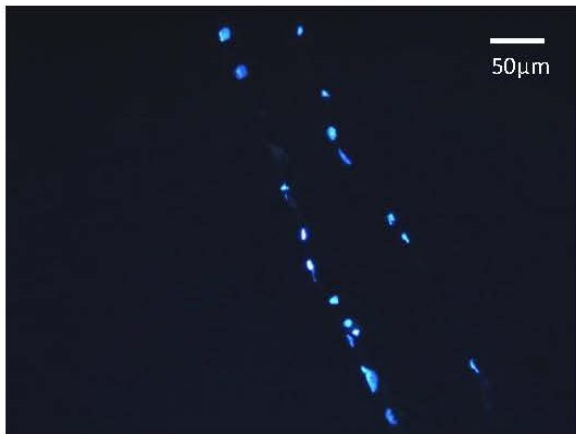
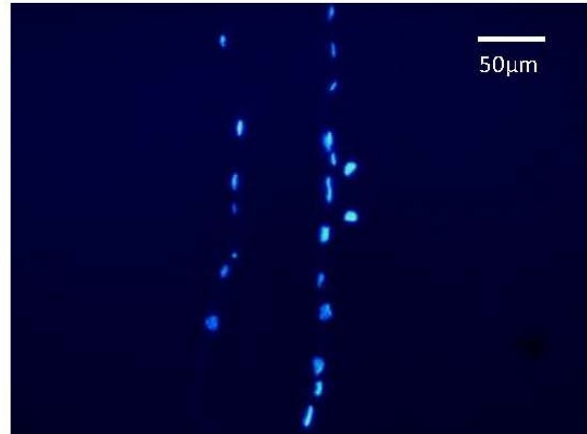
*Tabelle 10: Zelldichte der HUVECs 14 Tage nach Zellularisierung auf PLLA, PCL und PA-6*

Erläuterung: Zellkernfärbungen HQS und DVS im Vergleich; Zelldichte= Zellzahl pro Fläche in  $\text{n/mm}^2$ ; n= Anzahl der ausgewerteten Mikroskopaufnahmen

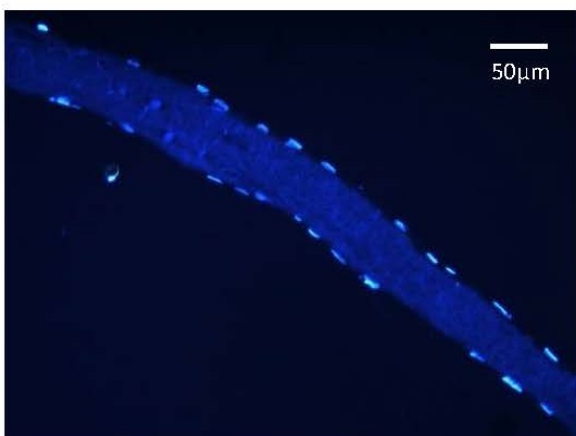
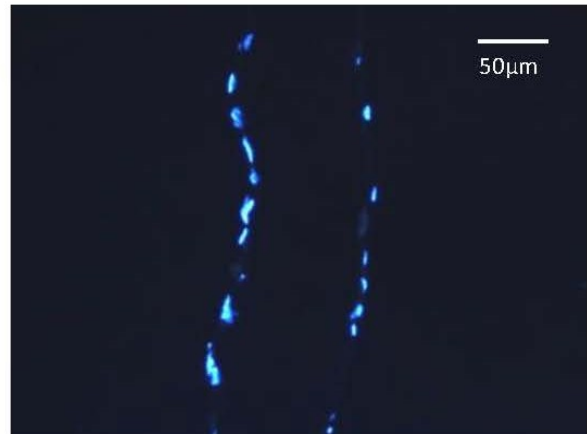
		<b>HQS: Zellzahl/<math>\text{mm}^2</math></b>	<b>DVS: Zellzahl/<math>\text{mm}^2</math></b>	<b>[(HQS+DVS)/2]: Durchschnittliche Zellzahl/<math>\text{mm}^2</math></b>
<b>PLLA</b>	MW STABW n	418,0 206,2 58	590,9 377,2 32	504,5 291,7
<b>PCL</b>	MW STABW n	577,0 241,5 70	473,8 277,2 84	525,4 259,3
<b>PA6</b>	MW STABW n	380,9 193,3 79	221,0 148,2 31	300,9 170,8



**A+B:** PLLA + EC-Fib, 14 Tage, DVS, 200fache Vergrößerung



**C+D:** PCL + EC-Fib, 14 Tage, DVS, 200fache Vergrößerung



**E+F:** PA-6 + EC-Fib, 14 Tage, DVS, 200fache Vergrößerung

#### **Abbildung 14: Histologie nach Zellularisierung (Tag14)**

Aufnahmen 14 Tage nach Zellularisierung, 200fache Vergrößerung, Zellkernfärbung der HUVECs mit DAPI Vectashield, **A+B:** zellularisiertes PLLA, **C+D:** zellularisiertes PCL, **E+F:** zellularisiertes PA-6

#### 3.3.5 Basalmembranentwicklung nach 14 Tagen Kultivierung

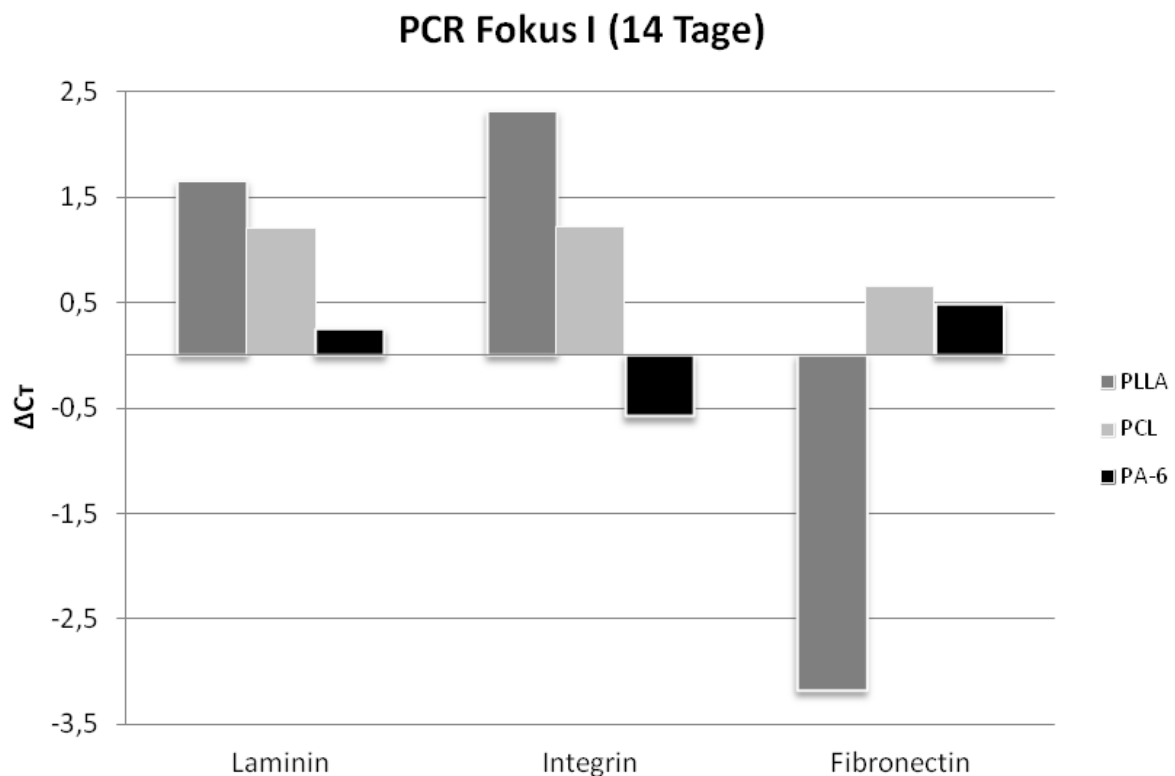
##### *Genexpression:*

Mit Hilfe der qRT-PCR konnte die Genexpression der HUVECs für einzelne basalmembranrelevante Proteine auf den Polymervliesen dargestellt werden. Die Endothelzellen auf den Polymeren PLLA, PCL und PA-6 wurden nach 14tägiger in-vitro Kultivierung auf die Genexpression für die Proteinbiosynthese von Laminin- $\alpha$ 1, Integrin- $\beta$ 1 und Fibronectin-1 untersucht. Die Ergebnisse wurden nach Normalisierung gegen die humane GAPDH als  $\Delta C_T$ -Werte dargestellt, hierbei ist die inverse Betrachtungsweise zu beachten. Niedrige  $C_T$ -Werte stellen eine vermehrte Genexpression dar (Abbildung 15). Es zeigte sich eine Expression aller untersuchten Gene auf den verschiedenen Polymervliesen. Wie bereits nach 24stündiger Kultur wurde Fibronectin-1 auf PLLA und PCL tendenziell vermehrt gebildet. Auffallend stellte sich die Genexpression der HUVECs auf PA-6 dar, welche eine tendenziell vermehrte Synthese von Integrin- $\beta$ 1 und Laminin- $\alpha$ 1 im Vergleich zu den anderen Substraten zeigte. Während die Zellen auf dem Substrat PCL wenig Veränderungen in der Genexpression nach 14 Tagen im Vergleich zu der Expression nach 24h aufwiesen, scheint sich die Ausprägung des genetischen Profils der Zellen auf PA-6 gewandelt zu haben (siehe auch Abbildung 12).

##### *Immunhistologie:*

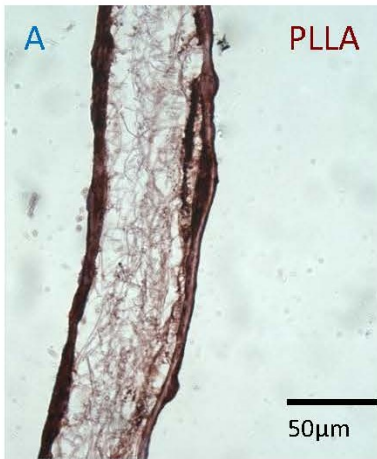
Die immunhistologischen Untersuchungen der zellularisierten Polymervliese wurden durchgeführt, um die erhoffte physiologische Basalmembranentwicklung nachzuweisen. Dazu wurden Antikörperfärbungen der Proteine Laminin1+2, Integrin- $\beta$ 1, Collagen-IV und Fibronectin an den Querschnitten der besiedelten Polymervliese durchgeführt und mit negativen Kontrollen sowie nativem Klappenmaterial verglichen. Für die Auswertung wurden lichtmikroskopische Bilder der gefärbten Schnitte erstellt, welche in 400facher Vergrößerung untersucht wurden (Abbildungen 16-19). In den qualitativen Analysen zeigte sich eine Endothelialisierung der Oberflächen mit partieller physiologischer Basalmembranentwicklung. Alle Proteine waren auf den drei untersuchten Substraten mit unterschiedlicher Anlagerung und Verteilung nachweisbar. Die Proteine fanden sich ähnlich einer Basalmembran als dünne Zwischenschicht an der Grenzfläche zwischen Endothelzellen und Polymervlies. Vergleichbar mit den gefärbten Schnitten der Aorten- und Pulmonalklappe vom Schwein zeigte sich überwiegend eine lineare Proteinorientierung bei den zellularisierten Polymersubstraten. Teilweise erschien die Proteinschicht jedoch inkomplett mit vereinzelt Proteinakkumulationen. Während die Proteine Integrin- $\beta$ 1 und Laminin1+2 vor allem um die angefärbten Zellkerne herum zellnah zu finden waren, färbte sich bei der Analyse von Collagen-IV

und Fibronectin die gesamte Oberflächenschicht der tissue-engineerten Substrate gleichmäßiger an. Auffällig zeigten sich die Fibronectinablagerungen bei allen Polymervliesen, welche durch das komplette Substrat hindurch zu finden waren, sodass sich die Fibronectinverteilungen deutlich von denen der nativen Kontrollen unterschieden. Bei den nativen Herzklappen vom Schwein stellte sich Fibronectin ähnlich wie die weiteren untersuchten Proteine vor allem randständig an der Oberfläche der Gewebe dar. Die von den Fluoreszenzuntersuchungen bekannte Eigenanfärbung des Polymers PA-6 kann auch beim Farbstoff NovaRed im Vergleich mit den anderen Geweben bestätigt werden. Eine gleichmäßige leichte Anfärbung der Nanofasern, welche bei PLLA und PCL nicht zu finden ist, konnte auch mit verschiedenen Etablierungstests beim Polymer PA-6 nicht verhindert werden und musste bei gegebener möglicher Abgrenzbarkeit der Proteine akzeptiert werden.

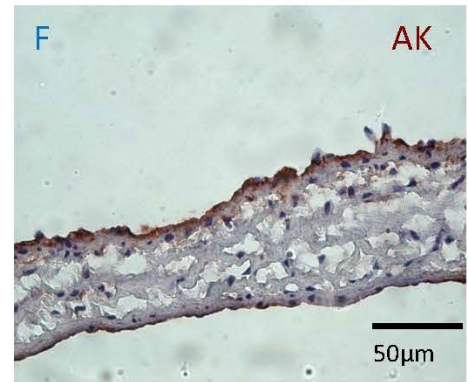


**Abbildung 15: qRT-PCR nach Zellularisierung (Tag14)**

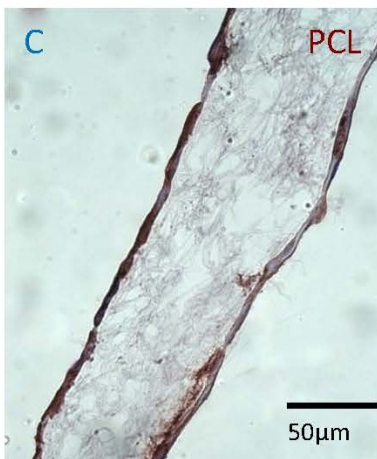
qRT-PCR-Daten der Endothelzellen 14 Tage nach Zellularisierung,  $\Delta C_T$ . Graph mit den Polymersubstraten PLLA, PCL und PA-6 mit der Genexpression der HUVECs für die Proteine Laminin- $\alpha 1$ , Integrin- $\beta 1$  und Fibronectin-1. Die Werte der Genexpression für das Protein Fibronectin-1 auf dem Polymer PLLA wurden aufgrund methodischer Schwierigkeiten in einem späteren Versuch unter gleichen Versuchsbedingungen (siehe auch Abbildung 24) nachgezogen und zur Veranschaulichung in diesen Graphen integriert.



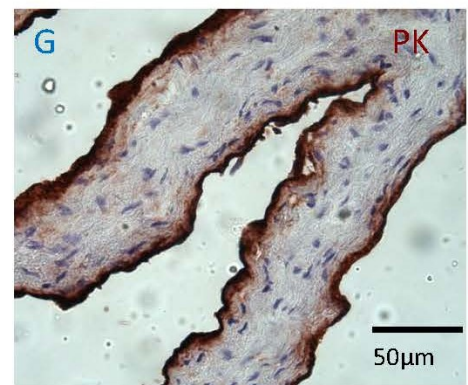
**A+B:** PLLA + EC-Fib, 14 Tage, Collagen IV + Hämatoxylin



**F:** Aortenklappe, Collagen IV + Hämatoxylin



**C:** PCL + EC-Fib, 14 Tage, Collagen IV + Hämatoxylin



**G:** Pulmonalklappe, Collagen IV + Hämatoxylin

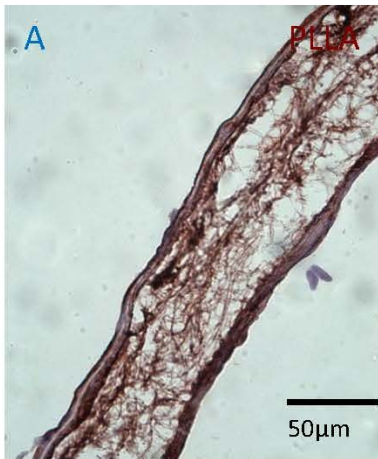


**D+E :** PA-6 + EC-Fib, 14 Tage, Collagen IV + Hämatoxylin

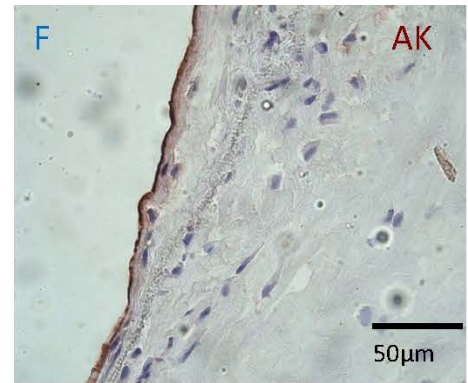
**Abbildung 16: Immunhistologie Collagen IV (Tag14)**

Aufnahmen 14 Tage nach Zellularisierung, 400fache Vergrößerung, Collagen-IV (rot), Zellkernfärbung der HUVECs mit Hämatoxylin (blau); **A+B:** zellularisiertes PLLA, **C:** zellularisiertes PCL, **D+E:** zellularisiertes PA-6, **F:** Aortenklappe, **G:** Pulmonalklappe





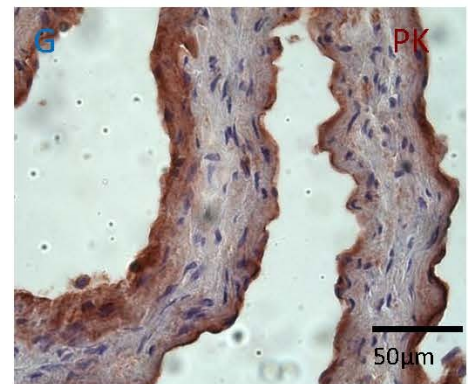
**A+B:** PLLA + EC-Fib, 14 Tage, Fibronectin + Hämatoxylin



**F:** Aortenklappe, Fibronectin + Hämatoxylin



**C:** PCL + EC-Fib, 14 Tage, Fibronectin + Hämatoxylin



**G:** Pulmonalklappe, Fibronectin + Hämatoxylin



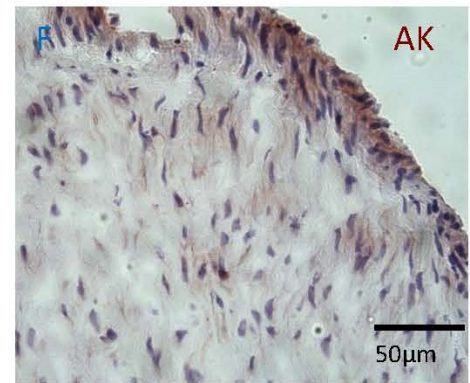
**D+E:** PA-6 + EC-Fib, 14 Tage, Fibronectin + Hämatoxylin

#### **Abbildung 17: Immunhistologie Fibronectin (Tag14)**

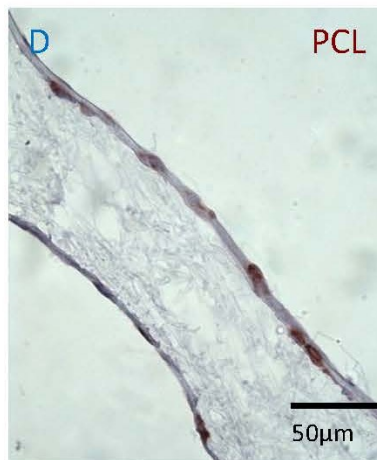
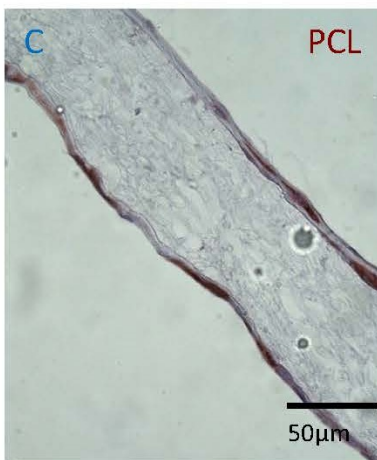
Aufnahmen 14 Tage nach Zellularisierung, 400fache Vergrößerung, Fibronectin (rot), Zellkernfärbung der HUVECs mit Hämatoxylin (blau); **A+B:** zellularisiertes PLLA, **C:** zellularisiertes PCL, **D+E:** zellularisiertes PA-6, **F:** Aortenklappe, **G:** Pulmonalklappe



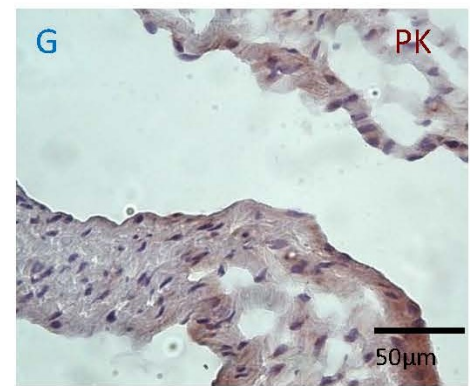
**A+B:** PLLA + EC-Fib, 14 Tage, Integrin  $\beta$ 1 + Hämatoxylin



**F:** Aortenklappe, Integrin  $\beta$ 1 + Hämatoxylin



**C+D:** PCL + EC-Fib, 14 Tage, Integrin  $\beta$ 1 + Hämatoxylin



**G:** Pulmonalklappe, Integrin  $\beta$ 1 + Hämatoxylin



**E:** PA-6 + EC-Fib, 14 Tage, Integrin  $\beta$ 1 + Hämatoxylin

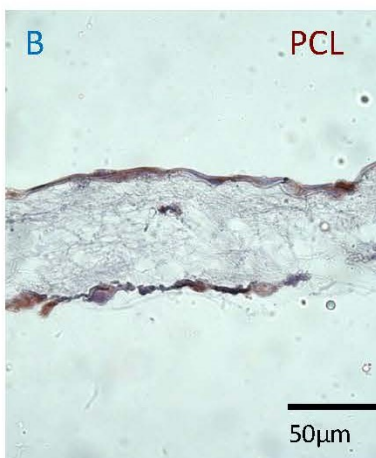
#### **Abbildung 18: Immunhistologie Integrin- $\beta$ 1 (Tag14)**

Aufnahmen 14 Tage nach Zellularisierung, 400fache Vergrößerung, Integrin- $\beta$ 1(rot), Zellkernfärbung der HUVECs mit Hämatoxylin (blau); **A+B:** zellularisiertes PLLA, **C+D:** zellularisiertes PCL, **E:** zellularisiertes PA-6, **F:** Aortenklappe, **G:** Pulmonalklappe

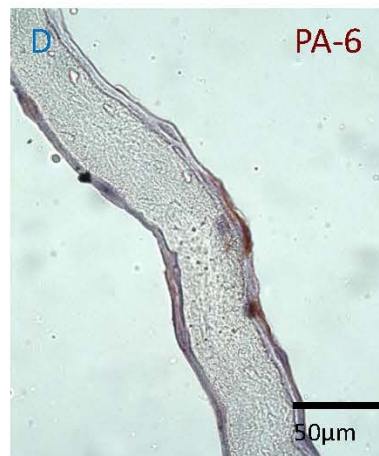
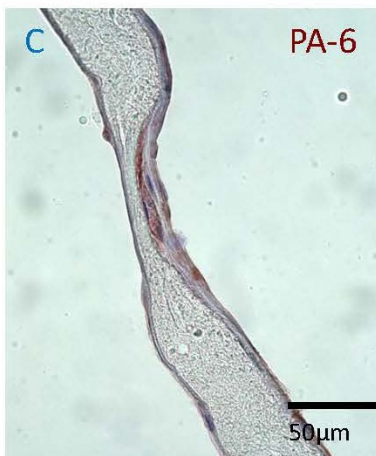




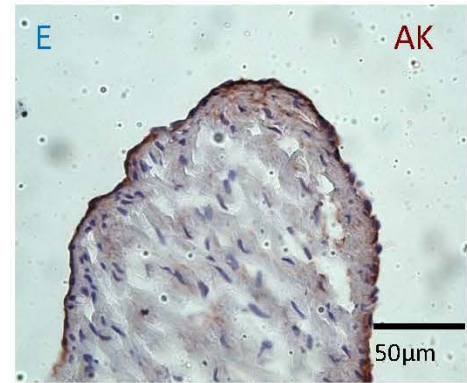
**A:** PLLA, + EC-Fib 14 Tage, Laminin 1+2+ Hämatoxylin



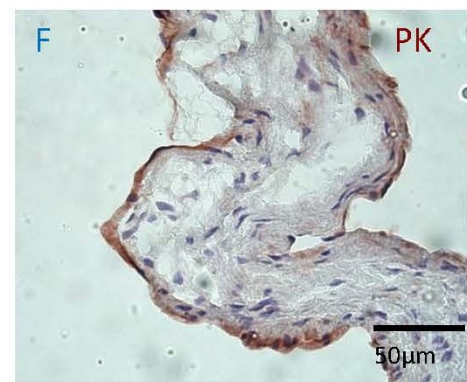
**B:** PCL + EC-Fib, 14 Tage, Laminin 1+2 + Hämatoxylin



**C+D:** PA-6 + EC-Fib, 14 Tage, Laminin 1+2 + Hämatoxylin



**E:** Aortenklappe, Laminin 1+2 + Hämatoxylin



**F:** Pulmonalklappe, Laminin 1+2 + Hämatoxylin

#### **Abbildung 19: Immunhistologie Laminin1+2 (Tag14)**

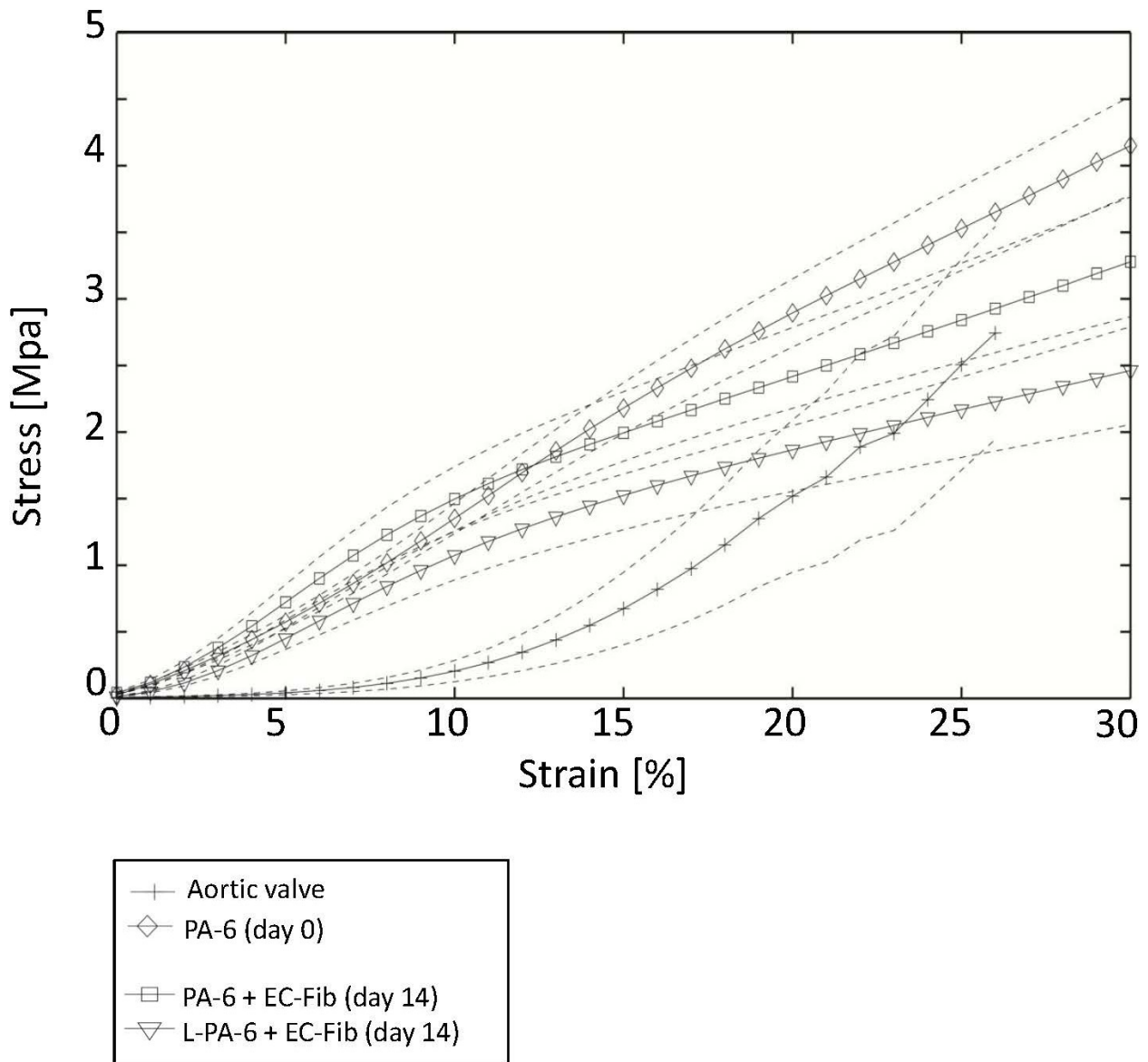
Aufnahmen 14 Tage nach Zellularisierung, 400fache Vergrößerung, Laminin1+2 (rot), Zellkernfärbung der HUVECs mit Hämatoxylin (blau); **A:** zellularisiertes PLLA, **B:** zellularisiertes PCL, **C+D:** zellularisiertes PA-6, **E:** Aortenklappe, **F:** Pulmonalklappe

#### **3.4 Fokus II: Auswirkung der Lamininbiofunktionalisierung von Polyamid-6**

Da die Beschichtung von Wellplatten mit dem Glykoprotein Laminin-1 in Vorversuchen des Labors einen moderat gesteigerten Adhäsionsprozess zeigte, wurde in einem zusätzlichen Versuchsansatz das Polymer Polyamid-6 mit Laminin-1 beschichtet. Der Effekt der Lamininbiofunktionalisierung wurde mit verschiedenen Methoden nach 14 Tagen Kultivierung untersucht. Das Substrat PLLA wurde teilweise als interne Kontrollgruppe bei den Untersuchungen verwendet. Es wurden erneut die mechanischen Eigenschaften des PA-6 nach Biofunktionalisierung und Endothelialisierung getestet sowie eine mikroskopische Betrachtung der Polymervliese durchgeführt. Außerdem wurde die Entwicklung der Basalmembran mit der qRT-PCR und mit Hilfe eines spezialisierten PCR-Arrays für die fokussierte Betrachtung spezieller Zellverbindungen untersucht.

##### **3.4.1 Mechanische Eigenschaften nach Biofunktionalisierung und 14 Tagen Kultivierung**

Nach 14tägiger Kultivierung der PA-6-Substrate mit Endothelzellen mit und ohne Lamininbeschichtung wurden die Vliese erneut mechanisch auf ihre Belastbarkeit und Dehnung untersucht. Es wurden Spannungs-Dehnungs-Diagramme mit den Einheiten MPa und Prozent erstellt (Abbildung 20). Bei den Polymervliesen, bei welchen die Endothelialisierung mit der Lamininbiofunktionalisierung kombiniert wurde, verringerte sich die Steifigkeit weiter. Verglichen mit den Untersuchungen der nicht behandelten Materialien, zeigte die Beschichtung mit EC-Fib sinkende Zugspannungen bei erhöhten Dehnungsebenen über 20%. Die erreichbare Zugspannung bei Dehnung des Materials über 20% sank durch die Lamininoberflächenbeschichtung weiter ab.



**Abbildung 20: Mechanische Eigenschaften der Materialien nach der Zellularisierung und Laminin-1-Biofunktionalisierung (Tag14)**

Spannungs-Dehnungs-Diagramme der zellularisierten Polymervliese, Polyamid-6 (PA-6) Tag 0 und nach 14 Tagen Zellularisierung, beschichtetes Polyamid-6 (L-PA-6) nach 14 Tagen Zellularisierung, Aortenklappe vom Schwein als Kontrolle [inklusive Mittelwert +/- Standardfehler]; *Stress [MPa]*= engl. Spannung, *Strain[%]*= engl. Dehnung; Graph erstellt durch D. Arbeiter, IBMT Rostock

#### 3.4.2 Endothelialisierung nach Biofunktionalisierung und 14 Tagen Kultivierung

##### *Rasterelektronenmikroskopie:*

Nach 14 Tagen statischer in-vitro Kultivierung der Polymere PA-6, L-PA-6 und PLLA wurden Präparate für das REM angefertigt und in 200facher Vergrößerung untersucht (Abbildung 21). In den Aufnahmen zeigte sich eine glatte Fibrinschicht mit einem konfluenten Kopfsteinpflaster-ähnlichem Relief auf allen drei Substraten. Vereinzelte Brüche der Schicht sind vermutlich auf methodenbedingtes Trocknen der Präparate für die Mikroskopie zurück zu führen. Geringe substratspezifische Unterschiede der Oberflächenstruktur zeigten sich zwischen PLLA und PA-6. Bei den Aufnahmen von PA-6 erschien das zelluläre Kopfsteinpflastermuster enger und regelmäßiger, wohingegen auf PLLA die Zellstruktur deutlicher hervortrat. Dadurch wirkte die Oberfläche etwas rauer und weniger regelmäßig.

##### *Zelldichte und Immunhistologie:*

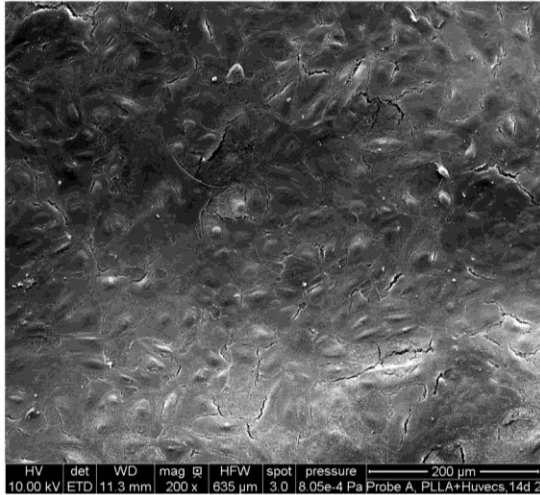
Die Zelldichte auf der Oberfläche des biofunktionalisierten PA-6 erschien nach 14tägiger Kultur vergleichbar mit jener auf dem unbehandeltem PA-6. Qualitativ zeigten sich die HUVECs in der Fluoreszenzfärbung auf L-PA-6 vital und mit einer linearen Endothelbildung (Abbildung 22). Bei einer quantitativen Auswertung der Zelldichte konnte eine durchschnittliche Zellzahl von 370,3 Zellen pro  $\text{mm}^2$  (+/- Standardabweichung = 236,0) ermittelt werden.

Nach 14 Tagen Kultivierung in Wachstumsmedium wurden die Endothelzellen, welche auf dem mit Laminin beschichteten PA-6-Substraten (=L-PA-6) gewachsen waren, auf die Entwicklung der Basalmembranproteine Laminin1+2, Integrin- $\beta$ 1, Collagen-IV und Fibronektin in Antikörperfärbungen untersucht. Hierzu wurden mit dem Lichtmikroskop Aufnahmen in 400facher Vergrößerung aufgenommen (Abbildung 23). In qualitativen Vergleichen mit Zellen, welche auf PA-6-Substraten ohne Biofunktionalisierung gewachsen waren sowie in den Kontrollen mit nativem Gewebe zeigten sich viele Gemeinsamkeiten (siehe Abbildungen 16-19). Teilweise schien die NovaRed-Farbe das Polymergewebe von L-PA-6 stark anzufärben; diese Tendenz zur Eigenaufnahme von Farbstoffen konnte bereits beim nicht-biofunktionalisierten PA-6 in den Experimenten zuvor beobachtet werden. Bei Collagen-IV zeigte sich eine etwas stärkere Anfärbung der Endothelschicht als bei den anderen Proteinen. Die Fibronektinfärbung stach mit der in den vorherigen Versuchen bereits beobachteten übergreifenden Färbung durch das Substrat hindurch hervor. Das Protein Integrin- $\beta$ 1 stellte sich wie bei den zuvor untersuchten Polymervliesen punktuell um die Zellkörper herum dar. Die Verteilung des Laminin1+2 bildete sich stärker linear als auf dem unbehandelten PA-6. Insgesamt ergab sich auf

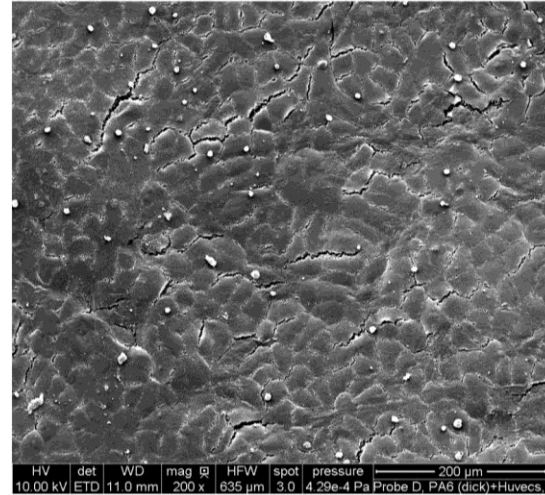
### 3. Ergebnisse

---

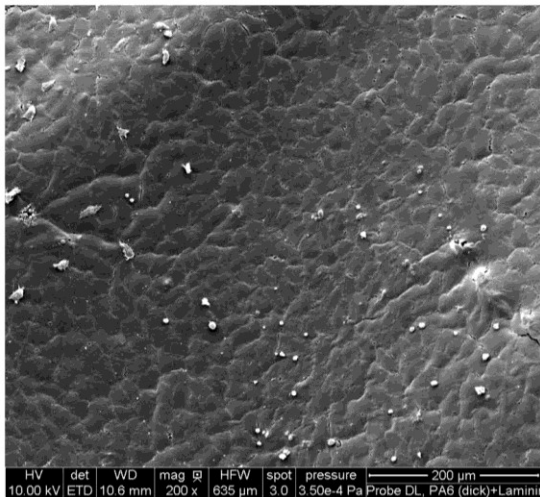
L-PA-6 eine gleich starke bis moderat erhöhte Synthese der Basalmembranproteine Laminin1+2, Integrin- $\beta$ 1, Collagen-IV und Fibronektin verglichen mit den PA-6-Substraten.



**A:** PLLA + EC-Fib nach 14 Tagen, 200fache Vergrößerung



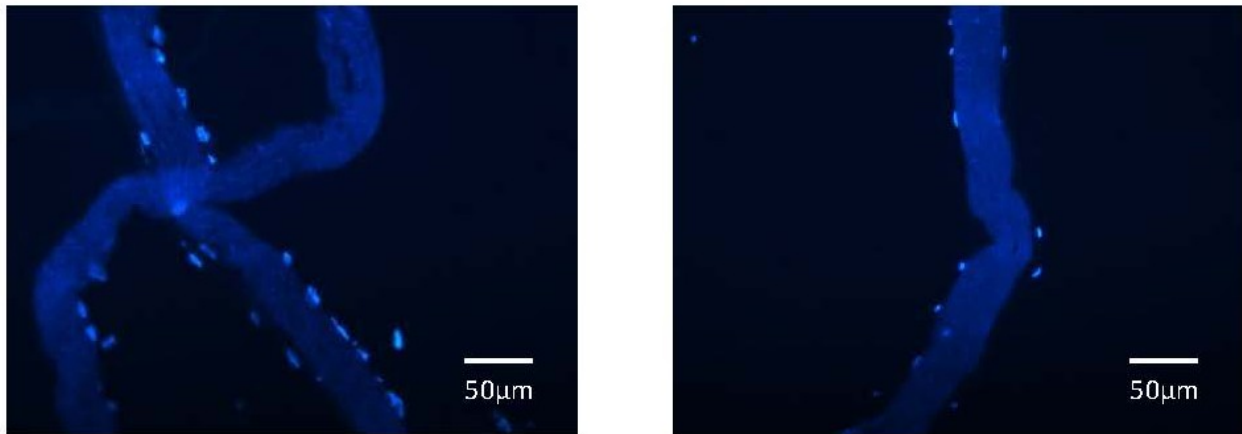
**B:** PA-6 + EC-Fib nach 14 Tagen, 200fache Vergrößerung



**C:** L-PA-6 + EC-Fib nach 14 Tagen, 200fache Vergrößerung

**Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen nach Zellularisierung und Laminin-1-Biofunktionalisierung (Tag14)**

Aufnahmen 14 Tage nach Zellularisierung mit HUVECs und Laminin-Beschichtung, 200fache Vergrößerung; **A:** PLLA+EC-Fib, **B:** PA-6+EC-Fib, **C:** L-PA-6+EC-Fib

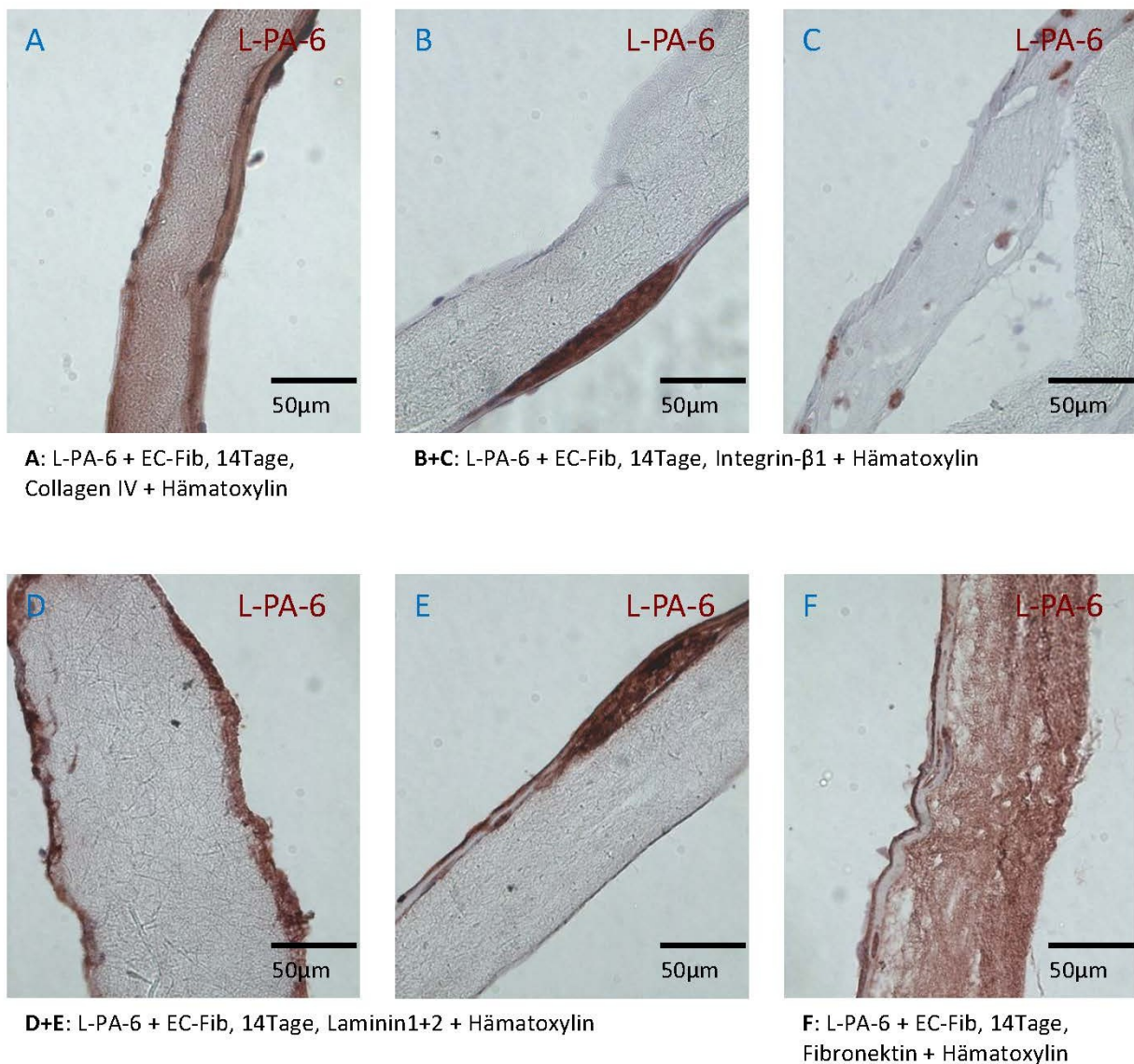


**A+B:** L-PA-6 + EC-Fib, 14 Tage, DVS, 200fache Vergrößerung

**Abbildung 22: Histologie nach Zellularisierung und Laminin-1-Biofunktionalisierung von PA-6 (Tag14)**

Aufnahmen 14 Tage nach Zellularisierung und Biofunktionalisierung, 200fache Vergrößerung, Zellkernfärbung der HUVECs mit DAPI Vectashield, **A+B:** L-PA-6+EC-Fib





**Abbildung 23: Immunhistologie nach Zellularisierung und Laminin-1-Biofunktionalisierung von PA-6 (Tag14)**

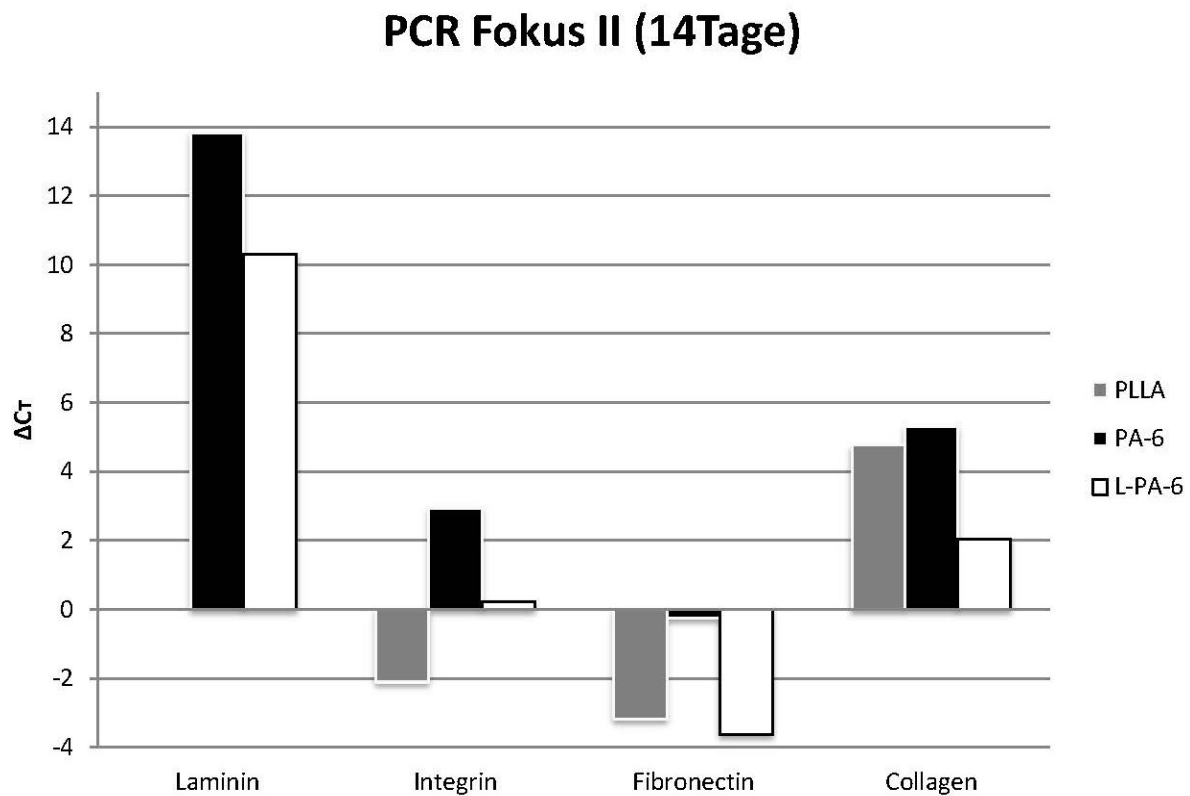
Aufnahmen 14 Tage nach Zellularisierung und Biofunktionalisierung von L-PA-6+EC-Fib, 400fache Vergrößerung, **A:** Collagen IV, **B+C:** Integrin- $\beta$ 1, **D+E:** Laminin1+2, **F:** Fibronectin (Immunfärbungen rot, Zellkernfärbung der HUVECs mit Hämatoxylin (blau))

#### 3.4.3 Basalmembranentwicklung nach Biofunktionalisierung und 14 Tagen Kultivierung

##### *Genexpression qRT-PCR:*

Die Endothelzellen auf den Polymersubstraten PA-6 und L-PA-6 wurden nach 14 Tagen Kultivierung mit der qRT-PCR auf die Genexpression der Basalmembranproteine Laminin- $\alpha$ 1, Integrin- $\beta$ 1, Fibronectin-1 und Collagen-IV untersucht. Im  $\Delta C_T$ -Graph werden die zur Genexpression inversen

Zahlen nach Normalisierung gegen das Referenzgen GAPDH dargestellt (Abbildung 24). Alle untersuchten Proteine wurden von den Zellen auf dem biofunktionalisierten Polyamid-6 aktiv synthetisiert. Hierbei zeigte sich die Tendenz einer vermehrten Genexpression für Integrin- $\beta$ 1, Fibronectin-1 und Collagen-IV. Die starke Proteinbiosynthese von Fibronectin-1 wurde bereits in den vorherigen Versuchen beobachtet. Eine geringere genetische Expression zeigte sich für Laminin- $\alpha$ 1. Auf dem biofunktionalisierten Substrat L-PA-6 ergab sich im Vergleich mit jenen Zellen, welche auf dem nicht-biofunktionalisierten PA-6 gewachsen waren, eine moderat erhöhte Genexpression der Basalmembranproteine. Als interne Vergleichsgruppe wurden die Proteine auf dem mit Endothelzellen besiedelten Substrat PLLA ebenfalls untersucht.



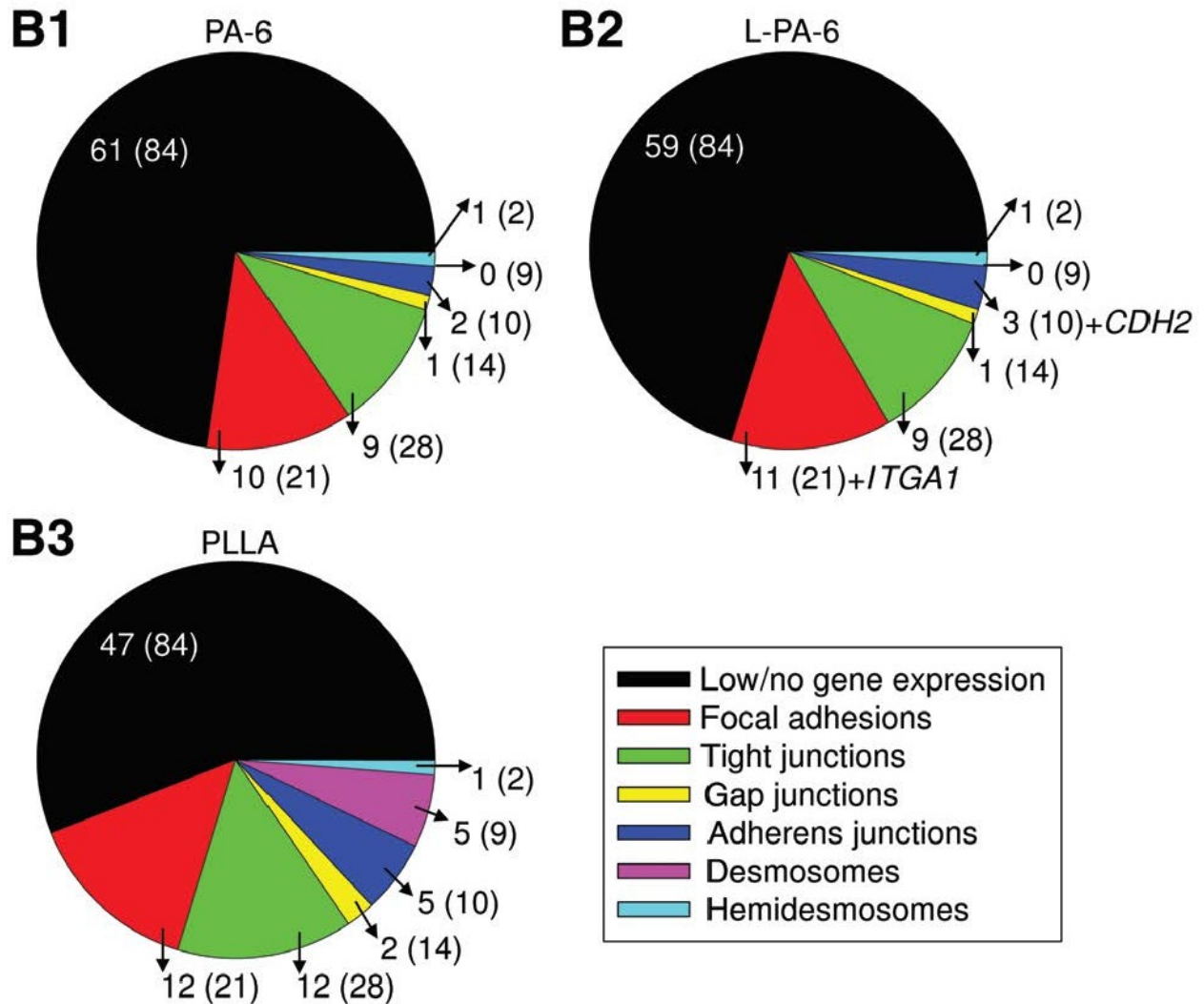
**Abbildung 24: qRT-PCR nach Zellularisierung und Laminin-1-Biofunktionalisierung (Tag14)**

qRT-PCR-Daten der Endothelzellen 14 Tage nach Zellularisierung und Laminin-1-Beschichtung,  $\Delta C_T$ -Graph der Polymersubstrate PLLA, PA-6 und L-PA-6 mit der Genexpression der HUVECs für die Proteine Laminin- $\alpha$ 1, Integrin- $\beta$ 1, Fibronectin-1 und Collagen-IV.

*Hinweis: die Genexpression der HUVECs für Laminin auf PLLA ist in Abbildung 15 zu finden.*

#### *Genprofil Zellverbindungen und Basalmembran/ PCR Array:*

Um die HUVECs auf den Substraten PA-6, L-PA-6 und PLLA 14 Tage nach der Zellularisierung auf ihr genetisches Profil mit dem Schwerpunkt Zellverbindungsproteine zu untersuchen, wurde der humane *Cell Junction Pathway Finder* PCR Array durchgeführt. Für die Untersuchung des Einflusses der Lamininbeschichtung auf die Basalmembranentwicklung wurde der Vergleich zwischen PA-6 und L-PA-6 vorgenommen. PLLA diente als Vergleichsmaterial für beide Substrate wie in zuvor durchgeführten Experimenten. Zur Darstellung der Genexpression wurden  $2^{-\Delta CT}$  Werte mit Werten über 1 in Tortendiagrammen abgebildet (Abbildung 25). Der Array zeigte eine erhöhte Anzahl und verschiedene Muster von exprimierten Genen auf PLLA (37 exprimierte von 84 untersuchten Genen) verglichen mit Anzahl und Mustern auf PA-6 (23 exprimierte von 84 untersuchten Genen) und L-PA-6 (25 exprimierte von 84 untersuchten Genen). Die ausgeprägte Genexpression von Desmosomengenen durch die Zellen auf dem Substrat PLLA (5 exprimierte von 9 untersuchten Genen) stellte einen deutlichen Unterschied zu den Substraten PA-6 und L-PA-6 dar. Auf L-PA-6 konnten zusätzlich Expressionen für das Adhäsionsgen ITGA1 aus der Gruppe der Integrine und das Gen CDH2 für Adherens Junctions aus der Cadheringruppe entdeckt werden, welche sich bei den PA-6- und PLLA-Substraten ohne Lamininbeschichtung nicht in ausreichender Expression fanden.



**Abbildung 25: PCR-Array *Cell Junction Pathway Finder* nach Laminin-1-Beschichtung und Zellularisierung (Tag14)**

Tortendiagramm mit den Polymersubstraten PLLA, PA-6 und L-PA-6 mit Genexpression der HUVECs von Basalmembranproteinen, Diagramm erstellt von Dr. C. Klopsch [61]

**B1:** PA-6 + EC-Fib, **B2:** L-PA-6 + EC-Fib, **B3:** PLLA + EC-Fib

## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion der Ergebnisse

Da es weltweit ein großes und wachsendes Interesse auf dem Gebiet des kardiovaskulären TE gibt, sollten alle Theorien, Methoden und Ergebnisse kontinuierlich kontrolliert, verbessert und immer wieder neu überdacht werden. Im folgenden Teil werden die Ergebnisse dieser Arbeit, aufgeteilt in verschiedene Teilaspekte, diskutiert sowie auf den aktuellen Stand der Forschung bezogen. Die Herausforderungen und Limitationen der Untersuchungen werden beschrieben und mit einem Ausblick auf weitere Forschungsmöglichkeiten ergänzt.

#### 4.1.1 Diskussion der mechanischen Eigenschaften

Zur Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften der künstlichen Klappenmaterialien wurden Spannungs-Dehnungs-Diagramme der einzelnen Materialien angefertigt. Es wurden die verschiedenen Polymervliese mit nativen Klappenmaterialien verglichen. In den Kurven zeigte das Substrat PA-6 unter den untersuchten Substraten die am besten geeigneten physikalischen Eigenschaften für das kardiovaskuläre TE, da es sich auch bei steigender Dehnung als suffizient belastbar mit entsprechender Zugspannung darstellte. Die Polymere PCL und PLLA hingegen stellten sich als weniger geeignet heraus, da sich die Vliesstreifen bereits bei geringer Zugspannung übermäßig stark dehnten. In Bezug auf den Einsatz als Herzklappenmaterial würde es bei PCL und PLLA zu irreversibler Dehnung der Gerüstsubstanz ohne Aufbau einer adäquaten Zugspannung kommen, was einen effektiven Klappenschluss und eine Aufrechterhaltung des Blutdrucks unmöglich macht. Bisher wird PCL in der Forschung als vielversprechendes Prothesenmaterial gehandelt und bietet diverse Vorteile wie langsame Degradationszeit, gute Modulierbarkeit, keine toxischen Abbauprodukte und gute Eigenschaften für die Zelladhäsion [75][76][5]. Die mechanischen Eigenschaften des PCL wurden in anderen Studien als vorteilhaft und tendenziell mechanisch etwas steifer im Vergleich mit anderen Polymeren beschrieben, was sich vermutlich durch unterschiedliche Methoden im Herstellungsprozess erklären lässt [75][77].

Aufgrund der durch das IBMT ermittelten mechanischen Eigenschaften der Substrate wurden tiefer gehende Analysen und Oberflächenmodifikationen primär für das Substrat PA-6 durchgeführt. Die Polymere PLLA und PCL wurden dennoch als interne Kontrollen in den Untersuchungen analysiert. Insgesamt ließ sich beobachten, dass keines der untersuchten Polymervliese vor oder nach Endothelialisierung sowie mit oder ohne Biofunktionalisierung den fast exponentiellen Verlauf in den uniaxialen Dehnungstests zeigt, welcher bei den nativen Geweben zu beobachten ist. Dieser

Unterschied zeigt die Notwendigkeit einer weiteren Intensivierung der Untersuchungen und Modulation der Materialien und Herstellungsprozesse.

Die in den Experimenten beobachtete höhere uniaxiale Steifigkeit von Pulmonalklappentaschen im Vergleich mit Aortenklappentaschen des Schweins ist in der Literatur beschrieben. Pulmonalklappen zeigen sich steifer während Biegung und weniger nachgiebig in biaxialen Zugfestigkeitstests. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Unterschiede zwischen den nativen Klappenarten und ihren Gewebsschichten sind noch nicht komplett verstanden und weiterhin Forschungsgegenstand. Es bestehen ebenfalls Unterschiede in der Elastin- und Kollagenzusammensetzung sowie in der Kollagenkonzentration zwischen Aorten- und Pulmonalklappen [78]. Ursächlich für das Zerreißen der nativen Materialien ab einer bestimmten Belastung können die physiologischen Gegebenheiten im Körper vermutet werden, da die Herzklappen an einen festgelegten Belastungsbereich inklusive der möglichen Schwankungen optimal adaptiert sind. Bei einer Belastung darüber hinaus kommt es zu einer Zerstörung der Muskelfasern und des Bindegewebes.

Eine adäquate Widerstandsfähigkeit des Grundgerüsts gegen Deformierungen ist eine der wichtigsten Grundlagen für valvuläre und vaskuläre Implantate [79]. Herzklappen sind während ihrer permanenten Leistung unter physiologischen Bedingungen besonders stark regional unterschiedlichen Belastungen ausgesetzt. Dazu zählen Scherspannung, Druckspannung, Umfangsspannung und Pulsatilität. Die Scherspannung kann durch Ausrichtung der Endothelzellen entlang der Strömung minimiert werden. Physiologisch findet eine zyklische Dehnung der Gefäßwand unter kontinuierlicher Belastung statt, sodass sich für diese Beanspruchung komplexe Netzwerke aus Kollagen- und Elastinfasern bilden. Das native Gewebe aus Schweineherzen konnte sich den Drücken und Belastungen im physiologischen Einsatz anpassen. Diese natürliche Adaptation an die Homöostase und aktive Regulation der Zusammensetzung erschwert die Entwicklung künstlicher Materialien, welche möglichst nativ-ähnliche Eigenschaften aufweisen sollen. Insgesamt zeigen moderne Prothesen des TE häufig in-vivo eine insuffiziente Mechanik und Stabilität auf. Ein möglicher Lösungsansatz könnte in der TE-Weiterentwicklung des valvulären Bindegewebes liegen, zum Beispiel durch die Modifikation von Elastinfasern oder durch den Einsatz künstlicher Nanofasern (siehe dazu 4.1.2 und 4.1.4)[26].

Eine weitere Anpassung der mechanischen Protheseneigenschaften an die nativen Materialien könnte mit einer Kultivierung im Bioreaktor erreicht werden, wodurch künstlichen Strukturen eine nativ-ähnliche Umgebung vorgegeben wird. Durch Veränderungen der Matrixproteinsynthese in bewegter Umgebung entstehen verbesserte mechanische Eigenschaften verglichen mit statischer Kultivierung [80]. Von Del Gaudio et al. konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, eine mechanisch funktionierende und stabile Herzklappe aus elektrogesponnenen Fasern zu gestalten. Bei

einer aus Nanofasern gesponnenen Klappe aus PCL wurde gesehen, dass die Spannungsverteilung auf verschiedene Bereiche der Klappe unter Flussbedingungen die Morphologie prägt, wenn das Gerüst annähernd physiologischen Bedingungen im Bioreaktor ausgesetzt ist. Die hämodynamische Charakterisierung zeigte funktionierende mechanische Flusseigenschaften der Herzklappe in Aortenposition [77][81][82][83].

Bei den Analysen für diese Arbeit wurde festgestellt, dass eine Endothelialisierung der Polymervliese die Substratsteifigkeit verringert. Auch die Biofunktionalisierung mit Laminin scheint die Elastizität im Vergleich mit den reinen Polymervliesen weiter zu steigern. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen überein, in welchen gezeigt werden konnte, dass eine Dezellularisierung von Gewebe zu einer vermehrten Steifigkeit der Materialien führt [84]. Eine Zellularisierung von Oberflächen führt schlussfolgernd vermutlich zu einer Annäherung an die physiologische Elastizität von nativem Gewebe.

Diverse Gewebsmodifikationen können die mechanischen Eigenschaften von TE-Herzklappenprothesen beeinflussen. Beispielsweise zeigt sich durch die Fixierung mit Hexamethylen-diisocyanat (HDI) eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften nativer Materialien. Natives Perikard ist natürlicherweise steifer als natives Herzklappengewebe, wandelt sich jedoch durch die HDI-Fixierung zu einem elastischeren Material und kann daher mechanisch betrachtet als Herzklappenersatz verwendet werden [64]. Auch auf dem vaskulären Forschungsgebiet bestehen ähnliche Ergebnisse. Im Vergleich zwischen nativer Aorta und künstlichen Gefäßprothesen wurde festgestellt, dass sich die mechanischen Eigenschaften der zellularisierten Polymere nach längerer Kulturzeit von drei und sechs Monaten denen des nativen Gewebes anpassten [85].

Keines der getesteten Polymersubstrate in dieser Arbeit – vor oder nach Zellularisierung – präsentierte ein physiologisches Verhalten im Sinne eines exponentiellen Graphenverlaufs in den uniaxialen Belastungstests. Dies und die Fähigkeit auf regional unterschiedliche Drücke und Belastungen reagieren zu können, stellen sich als wichtigste Voraussetzungen für valvuläre und vaskuläre Gerüste heraus. Der Herstellungsprozess nativ-ähnlicher Herzklappen wird dadurch herausfordernd, dass die optimale Struktur der Klappen im natürlichen Einsatz während der Homöostase permanent reguliert wird, was im aktuellen TE durch Einführung von Bioreaktoren genutzt wird [77][81][82]. Die durchgeführten Versuche veranschaulichten, dass eine Endothelialisierung die Substratsteifigkeit reduziert und damit die Flexibilität erhöht, was besonders deutlich bei den mit Laminin-1 beschichteten Gewebeäquivalenten aus Polyamid-6 zu sehen war.

### 4.1.2 Diskussion der Nanofaserbetrachtung

Die Betrachtung der Nanofasern der Polymervliese dieser Arbeit mit dem REM zeigte, dass sich keine Poren innerhalb der Fasern bildeten und sich die Fasern wie gewünscht überwiegend zufällig anordneten. Da im Versuchsansatz eine oberflächliche Beschichtung mit Zellen geplant war und keine Poren gewünscht waren, stellten sich alle drei Polymervliese in dieser Hinsicht als geeignet dar. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde kein Einwachsen der Zellen in die Polymersubstrate beobachtet, was zu den gegebenen Bedingungen passt.

In der Forschung werden aktuell verschiedene Methoden getestet, um die Fasern der nativen Herzklappenstrukturen nachzubilden. Das Elektrosponningverfahren ermöglicht die Bildung von fibrösen Grundgerüsten mit oder ohne gerichtete Fasernanordnung [49]. Es konnte festgestellt werden, dass die native extrazelluläre Matrix anisotrope Eigenschaften aufweist, welche bei künstlichen Substraten durch eine Ausrichtung der Fasern reproduzierbar sind. In einer Studie mit porösem PCL und ausgerichteten Fasern wuchsen humane Zellen gut in das Gewebe ein und bildeten Basalmembranproteine. Die Zellen verlängerten und formten sich entlang der Nanofasern [86]. Modifizierungen der Grundgerüste mit verschiedenen Formen, Materialien und Fasern werden daher aktuell angewendet, um komplexe Strukturen ähnlich der nativen dreischichtigen Klappen herzustellen [53].

### 4.1.3 Diskussion der Zellvitalität und Endothelialisierung

Die physiologische Endothelialisierung und die Entwicklung einer Basalmembran mit funktionalen Zellverbindungen auf künstlichen Prothesenmaterialien sind sowohl von der konzeptionellen, als auch von der analytischen Seite aus gesehen stark herausfordernde Ziele.

Eine vollständige initiale Zellularisierung mit HUVECs konnte 24 Stunden nach Zell-plus-Fibrin-Aussaat auf den Polymersubstraten PLLA, PCL und PA-6 ohne akute Reaktionen im Sinne einer Zelltoxizität festgestellt werden. Es wurde zu diesem Zeitpunkt eine komplette Oberflächenbedeckung der Vliese mit teilweise ausgeprägter Kopfsteinpflaster-Struktur der Zellen im REM identifiziert. Die ermittelten Zelldichtezahlen zeigten nur moderate Unterschiede zwischen den Polymeren, was bei geringer Probenanzahl und 24stündiger Kultivierung noch nicht als substratspezifisch gedeutet werden kann.

Die Verteilung der Endothelzellen auf der Polymeroberfläche zeigte sich in unseren Experimenten nach 24 Stunden Kultivierung bei allen Substraten noch unregelmäßig, passte sich jedoch über das von HUVECs bekannte Konfluenzverhalten nach 14 Tagen einer linearen Struktur an, was für eine funktionierende Zell-Zell-Interaktion und den Beginn einer physiologischen Endothelentwicklung spricht. Die erkennbaren Unterbrechungen in der oberflächlichen Zellschicht, welche nach 24



Stunden stärker zu beobachten waren als nach 14tägiger Kultivierung, haben vermutlich methodisch bedingte Ursachen. Die beobachtete größere Regelmäßigkeit in der Zellverteilung nach 14 Tagen deutet somit auch auf eine verbesserte Endothelzellbindung an den Substraten hin, da diese eine geringere Zellablösung während der methodischen Aufbereitung der Proben zur Folge hätte. Eine moderate quantitative Vermehrung der Zellen war auf dem Substrat PA-6 zu beobachten, welches sich auch aus mechanischer Sicht als möglicherweise geeignetes Polymervlies darstellte. Insgesamt zeigten die überwiegend qualitativen Analysen zur Zellvitalität auf allen Substraten eine Akzeptanz der Zellen gegenüber den Polymeren als Grundgerüste.

### 4.1.4 Diskussion der Basalmembranentwicklung

Zur Untersuchung der Basalmembranentstehung wurden 14 Tage nach Zellularisierung immunhistologische Analysen von Querschnitten der zellularisierten Polymervliese durchgeführt. Hierbei zeigte sich auf allen Substraten größtenteils eine physiologische, jedoch noch unreife Basalmembranorganisation mit vorwiegend linearen Proteinausrichtungen für Laminin1+2, Integrin- $\beta$ 1 und Collagen-IV verglichen mit nativen Kontrollen von Aorten- und Pulmonalklappe. Die Ergebnisse sprechen für einen vitalen Zellzyklus mit dem Beginn einer Basalmembranbildung auf den künstlichen Materialien. Teilweise wurden auch nicht-physiologische, irreguläre Proteinhäufungen und Fibronektinablagerungen beobachtet, was auf den Bedarf an einem verbesserten Verständnis der zugrundeliegenden zellphysiologischen Mechanismen während der Endothelialisierung und die Optimierung des Endothelialisierungsprozesses hinweist.

In den Untersuchungen zur Basalmembranbildung stach besonders das Protein Fibronektin heraus. Es ist Bestandteil der Basalmembran und der extrazellulären Matrix und kann durch alternatives Spleißen<sup>20</sup> der precursor-mRNA in vielfältigen Formen vorliegen, obwohl es nur das Produkt eines Gens ist. Daher spielt es bei vielfältigen Zellinteraktionen wie Zelladhäsion, Migration, Wachstum und Differenzierung eine Rolle. Das unlösliche Fibronektin existiert im Gegensatz zum löslichen Fibronektin in verschiedenen, stark zellspezifischen Formen. Durch das Spleißen können Zellen die spezifische Komposition ihrer extrazellulären Matrix beeinflussen. An der Bindungsregion  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 vom Integrin bindet Fibronektin als Ligand zur Verbindung von extrazellulärer Matrix und intrazellulärem Zytoskelett. Außerdem bindet Fibronektin auch an Heparin, Fibrin und Kollagen [30]. Fibronektin wurde in unseren Experimenten von den Endothelzellen vermehrt gebildet und verteilte sich ubiquitär in den immunhistologischen Färbungen, was jedoch in Kontrast zu den nativen Kontrollen

---

<sup>20</sup> von engl. splicing = miteinander verbinden

stand und den Status einer noch unreifen Basalmembranentwicklung auf den Polymervliesen unterstrich.

Möglicherweise beeinflusste das verwendete Fibringel des Sprühprozesses die Bildung von Fibronectin durch oben genannte Bindungsstellen und zellspezifische Anpassungen. Ob sich das Fibronectin, wie in den Färbungen anzunehmen, durch das gesamte Polymer erstreckt oder hier gegebenenfalls auch eine methodische Täuschung vorlag, bedarf weiterer Untersuchungen. Das genutzte Fibringel offenbarte sich bisher in Untersuchungen anderer Forschungsgruppen als eine geeignete Biomatrix mit förderlichem Charakter in Bezug auf die Angiogenese und kann ebenfalls zur dreidimensionalen Entwicklung von Gerüsten verwendet werden [52][87].

Als gut geeignetes Grundgerüst für die Entwicklung einer Basalmembran stellte sich PA-6 dar, da alle untersuchten Proteine, insbesondere Integrin, nach 14tägiger Kultivierung auf dem Substrat von den HUVECs vermehrt synthetisiert wurden. Integrine sind Rezeptoren in der Zellmembran und regulieren diverse Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen. Sie verbinden die Zellen mit der Umgebung, können Signale verbreiten und regulieren über zytoplasmatische Domänen auch intrazelluläre Vorgänge wie Zellmorphologie und Migrationsverhalten. Auch hier sind viele Isoformen durch alternatives Spleißen der mRNA bekannt [88]. In den immunhistologischen Untersuchungen dieser Arbeit konnte Integrin zellkernnah nachgewiesen werden. Da Laminin an die Integrine bindet, zeigte sich hier eine ähnliche zellnahe Verteilung. Collagen-IV hingegen wurde auf der gesamten Substratoberfläche gefunden und teilweise durch das gesamte Polymer hindurch. Als netzwerkbildendes Faserprotein der Basalmembran und wesentliche Komponente der extrazellulären Matrix erscheint eine flächenhafte Verteilung des Collagen-IV auf den Substraten physiologisch. Das Protein Kollagen gilt durch seine stabile Verteilung auch als optimales Biomaterial für die Konstruktion von TE-Herzklappenprothesen [89][29][26].

Substratspezifische Unterschiede in der Zellularisierung und Endothelialisierung während der Gewebeentwicklung sind aktuell noch Gegenstand der Forschung. Die Kontaktfläche zwischen den Zellen und dem Gerüst scheint aber im kardiovaskulären TE für den funktionalen Erfolg entscheidend zu sein. Auch die Prothesenthrombogenität und die vaskuläre Heilung wird durch die Zell-Matrix-Interaktion stark beeinflusst [90]. In der aktuellen Forschung steht das Verstehen der Komplexität der endothelialen Basalmembran und ihrer dynamischen Struktur noch am Anfang [32]. Grundlegend für die weitere Forschung auf dem Gebiet der Herzklappenentwicklung mittels TE scheint das physiologische Wissen über die Basalmembran und ihre Bestandteile zu sein. Dieses Wissen und Verständnis muss vertieft werden, um die zugrundeliegenden Zellprozesse in die Entwicklungen mit einbeziehen zu können.

Die physiologischen Vorgänge der Adhäsion sind sowohl von den Grundgerüsten beeinflusst als auch von den unterschiedlichen Zellarten abhängig. Ein Beispiel für eine verbesserte Zelladhäsion durch Nutzung unterschiedlicher Zellphysiologien wurde bei in-vitro Experimenten durch Wallace et al. veranschaulicht, in welchen durch den Einsatz von Kokulturen aus Endothelzellen und Muskelzellen die Entwicklung der subendothelialen Basalmembran verstärkt wurde, sodass die individuellen Rollen der unterschiedlichen Zellarten zu diskutieren sind [91][4]. Neben Endothelzellen und Muskelzellen scheinen auch valvuläre interstitielle Zellen eine wichtige Rolle für die Gewebshomöostase und die physiologische Anpassung an Umgebungsveränderungen zu spielen, womit ein weiterer interessanter Zelltyp für zellbiologische Untersuchungen zur Verfügung steht [92][93]. Aus der aktuellen Studienlage wird deutlich, dass die zellspezifischen Zellularisierungsmechanismen *zusätzlich* zu den spezifischen chemischen und physikalischen Faktoren der Grundgerüstsubstrate auftreten. Dass sich die verschiedenen Polymere spezifisch auf die Zellvitalität, Adhäsion und Proliferation der ausgesäten Zellen auswirken, konnte durch die Experimente dieser Arbeit tendenziell bestätigt werden und stellt die Forschung vor komplexe Herausforderungen [4][94][95].

Um die Modifizierbarkeit der anpassbaren Polymergerüste aus Nanofasern für eine verbesserte Endothelialisierung zu nutzen, wird das Material häufig mit den nativen Herzklappen verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass sich physiologischerweise anisotrope Eigenschaften in der extrazellulären Matrix der Klappengewebe zeigen, welche in künstlichen Substraten durch gerichtete Fasern erzeugt werden können und die Zelleigenschaften beeinflussen können. In dieser Arbeit war nicht die Ausrichtung der Nanofasern, sondern eine zufällige Faseranordnung während des Elektrosponningverfahrens das gewünschte Ziel. Ob die deutlicher erkennbare Zellstruktur der HUVECs im REM nach 14 Tagen auf dem Substrat PLLA und die vermehrte Basalmembranproteinexpression im durchgeführten PCR-Array nach 14 Tagen im Vergleich mit den Zellen, die auf Polyamid-6 gewachsen waren, aus den chemischen oder physikalischen Substrateigenschaften resultiert, sollte weiter untersucht werden. Ergebnisse der Studie von Sohier et al. mit explizit ausgerichteten Nanofasern und humanen Fettstammzellen sowie valvulären interstitiellen Zellen auf PCL zeigten einen Einfluss der Substrateigenschaften auf die Organisation der Basalmembran [86]. Ein Zusammenhang zwischen der Nanofaserausrichtung und der Entwicklung der Basalmembran auf künstlichen Gewebesubstraten kann vermutet werden.

### **4.1.5 Diskussion der Auswirkung von Laminin auf die Endothel- und Basalmembranbildung**

Die Laminine sind eine Gruppe von trimeren Glykoproteinen der extrazellulären Matrix und spielen eine wichtige Rolle beim Aufbau der Basalmembran von Zellen [88]. Das für die Beschichtung des Polymers PA-6 verwendete Laminin-1 kommt nicht in endothelialen Basalmembranen vor, kann

jedoch hoch standardisiert in großen Mengen aus dem EHS-Tumor der Maus zur Verfügung gestellt werden und ist daher bei in-vitro Experimenten weit verbreitet [32]. In Vorversuchen konnte eine starke Adhäsionsdynamik der HUVECs auf adsorbierend laminingebundenen künstlichen Oberflächen in Abhängigkeit von der Laminin-1-Konzentration festgestellt werden [61]. Daraus wurde vermutet, dass das Basalmembranprotein Laminin-1 die endotheliale Zelladhäsion auch auf künstlichen Grundsubstraten aus Polymeren verstärkt. Die für die Zelladhäsion notwendigen endothelspezifischen Bindungsstellen befinden sich an der  $\gamma$ 1-Kette des Laminins und sind ebenfalls wichtig für den Aufbau von Zell-Zell-Verbindungen [96]. Auch bei der Entstehung und Differenzierung der Basalmembran in der embryonalen Entwicklung spielt Laminin-1 eine wichtige Rolle und wurde daher für unsere Experimente zur Basalmembranentwicklung auf künstlichen Substraten als Protein für die Biofunktionalisierung gewählt [35].

Die Biofunktionalisierung vom Substrat PA-6 durch Laminin-1 erbrachte eine komplette Kopfsteinpflaster-ähnliche Endothelialisierung der HUVECs mit aktiver Genexpression und vorwiegend linearer Orientierung der Basalmembranproteine in den immunhistologischen Analysen. Wieder zeigte sich die Verteilung von Collagen-IV und Fibronectin durch das gesamte Polymer und die Integrinverteilung zellkernnah. Das gebildete Laminin auf L-PA-6 konnte linear gesehen werden, was für eine gleichmäßige Ausbildung der Zell-Matrix-Verbindungen entlang der Oberfläche spricht.

In den Untersuchungen dieser Arbeit zur Genexpression mithilfe der qRT-PCR ließ sich die aktive Synthese von Basalmembranproteinen durch die Endothelzellen nachweisen. Auf den mit Laminin-1 beschichteten PA-6-Substraten zeigte sich eine aktive Genexpression für die Proteine Fibronectin-1 und Integrin, gefolgt von Collagen-IV und Laminin. Insgesamt konnte auf dem biofunktionalisierten Substrat L-PA-6 die Tendenz einer moderat verstärkten Genexpression der Basalmembranproteine beobachtet werden gegenüber jenen Zellen, welche auf dem nicht-biofunktionalisierten PA-6 gewachsen waren. Diese Ergebnisse können die Erkenntnisse über den Stellenwert des Glykoproteins Laminin für die endotheliale Zelladhäsion auf künstlichen Oberflächen bestätigen. In Untersuchungen anderer Gruppen zeigten poröse Gefäßprothesen, welche mit kovalent gebundenen Laminin-1 überzogen wurden, eine verbesserte Neovaskularisation und Endothelialisierung in-vivo, wodurch die Prothesenthrombogenität sank [97]. Santiago et al. demonstrierten an PCL-Oberflächen, dass kovalent gebundene Lamininpeptide die Stammzelladhäsion an TE-Polymergerüsten verbessern [98]. Es lässt sich vermuten, dass möglicherweise eine kovalente Bindung sowie die Wahl spezifischer vaskulärer Laminine 8 und 10 oder spezifischer Peptide vaskulärer Laminine den Endothelialisierungsprozess an Polymergerüsten weiter fördern.

Wie Beobachtungen anderer Forschungsgruppen ergaben, bieten sich auch weitere Basalmembranproteine zur Beschichtung von künstlichen Substraten an. Es konnte festgestellt

werden, dass verschiedene Zellarten auf Fibronectin und Kollagen-Beschichtungen bessere Adhäsionsergebnisse zeigten als auf Laminin- oder Gelatinbeschichtungen [99]. Ein Vergleich unterschiedlicher Proteine als Biofunktionalisierungen auf den Polymersubstraten in weiteren Untersuchungen erscheint interessant. Auch Pfeiffer et al. konnten einen positiven Effekt einer Fibronectinbeschichtung auf die Zelldichte und das Wachstum von Endothelzellen aus der Plazenta auf Prothesen aus Polymeren feststellen [4]. Außerdem stellen die verschiedenen kovalenten und nicht nicht-kovalenten Bindungsarten des Glykoproteins Laminin an künstlichen Oberflächen sowie die verschiedenen Lamininisoformen weitere Punkte für Untersuchungen dar.

### **4.1.6 Diskussion der Auswirkung von Laminin auf spezifische Zellverbindungen**

Darüber hinaus stellte die Analyse der Zellverbindungen mithilfe des PCR-Arrays dar, dass der Endothelialisierungsprozess substratspezifisch verläuft mit verschiedenen Genprofilen der HUVECs. Die Bildung von Zell-Zell- sowie Zell-Matrixverbindungen war auf allen getesteten Polymervliesen über die Genexpression nachweisbar. Die meisten für eine funktionierende Endothelzellschicht wichtigen Zellverbindungsproteine wurden auf PA-6, L-PA-6 und PLLA gebildet. Dazu zählen die Tight junctions, welche Epithel- und Endothelzellen miteinander verbinden und die Gap junctions, über welche die Zellen kommunizieren. Desweiteren konnten mit dem Array die Ausbildung von Adherens junctions und Desmosomen festgestellt werden, welche vor allem Zell-Zell-Kontakte um das Protein Cadherin bilden sowie Fokale Kontakte und Hemidesmosomen, welche wiederum Zell-Matrix-Kontakte um das Protein Integrin formen. Die Expression der Gene, welche für die Synthese subzellulärer Strukturen stehen, zeigt den Versuch einer Basalmembranbildung der HUVECs auf den Substraten. Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse für die allgemeine Zellvitalität und die Akzeptanz der Grundgerüste als mögliche Wachstumsbasis.

Es konnten Tendenzen substratspezifischer Unterschiede festgestellt werden, die durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müssen. Auf PA-6 und L-PA-6 kam es nicht zur Desmosomenbildung, wohingegen sie auf dem Polymer PLLA zu finden war. Eine generell erhöhte Zahl der induzierten Gene zeigte sich auf dem nicht-modifizierten Polymer PLLA. Eine mögliche Erklärung hierfür kann nur in der tiefer gehenden Analyse der Polymerbestandteile und ihrer Struktur erbracht werden. Unterschiedliche funktionale Oberflächengruppen oder der physikalisch hydrophobe Charakter des PLLA, welcher bisher jedoch als Erklärung für die eher langsame Zelladhäsion auf PLLA galt, könnten Gründe für eine unterschiedliche Geninduktion sein [100]. Da die Desmosomen eine wichtige Rolle für Zell-Zellverbindungen spielen, ist eine Abklärung der gegebenenfalls Desmosomen-ablehnenden Charakteristik des PA-6 von großer Bedeutung und rechtfertigt weitere Untersuchungen.

Weitere Substratspezifitäten zeigten sich bei dem Adhäsionsgen ITGA1<sup>21</sup> und dem Gen CDH2 für Adhäsionskontakte, welche auf L-PA-6 exklusiv gebildet wurden. ITGA1 kodiert die Untereinheit  $\alpha 1$  der Integrinrezeptoren und kann zusammen mit der  $\beta 1$ -Untereinheit den Oberflächenrezeptor auf Zellen für die Adhäsionsproteine Kollagen und Laminin der extrazellulären Matrix bilden. Integrine sind transmembrane heterodimere Rezeptoren, welche sowohl bei Zell-Matrix-, als auch bei Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle spielen. Das Integrin  $\alpha 1$ - $\beta 1$  findet sich in mesenchymalem Gewebe, im Immunsystem und in epithelialen Geweben. Über Signale der  $\alpha 1$ -Domäne kann die Komposition der extrazellulären Matrix reguliert werden [101]. Der Rezeptor spielt auch in der Embryogenese von Muskelzellen eine Rolle, kann bei in-vitro Experimenten mit kultivierten HUVECs exprimiert werden und wurde in Zellen der kleinen Gefäße entdeckt. Erwähnenswert ist, dass alle lamininbindenden Integrine in Endothelzellen dynamisch von Zytokinen und Wachstumsfaktoren der Angiogenese reguliert werden [102][88].

Die Bindung zwischen den  $\alpha$ -und- $\beta$ -Ketten der Laminine aus der extrazellulären Matrix und denen der Integrine induziert die Basalmembranbildung und moduliert dynamisch die Basalmembrankomponenten [35]. Unter anderem bestehen die als Hemidesmosomen bezeichneten Befestigungspunkte aus Integrinen, welche außerhalb der Zelle an Laminin binden und innerhalb der Zelle an Keratinfilamenten [28]. Viele verschiedene Lamininisoformen und Integrinzahlen ermöglichen Zelldifferenzierungen und machen aktuell die Darstellung der möglichen Verbindungen herausfordernd [88]. Besonders in endothelialen Basalmembranen scheint die Vielfalt der Lamininkompositionen einzigartig zu sein, da eine kontinuierliche Schicht wichtig für die Gefäßwandintegrität ist. Die extrazelluläre Matrix stellt sich in Endothelzellen stets dynamisch dar, in Abhängigkeit vom Endotheltyp und der physiologischen Situation.

Obwohl sich physiologischerweise in vaskulären Endothelien die zwei Lamininisoformen 8 ( $\alpha 4$ - $\beta 1$ - $\gamma 1$ ) und 10 ( $\alpha 5$ - $\beta 1$ - $\gamma 1$ ) exklusiv finden, für welche am Rezeptor Integrin- $\alpha 6$ - $\beta 1$  spezifische Interaktionsstellen bereit stehen, wurde festgestellt, dass in-vitro die Bindung der Endothelzelladhäsion zum Laminin-1 stärker zu sein scheint [32][103, 104]. Aufgrund dieser Erkenntnisse scheint es möglich, dass die Laminin-1-Biofunktionalisierung des PA-6 die Expression des ITGA1 der HUVECs, welche ohne die Laminin-1-Biofunktionalisierung auf PA-6 und PLLA nicht stattgefunden hat, über spezifische Signale und Modulationsmöglichkeiten beeinflusst hat. Ein weiterer Unterschied zeigte sich in der exklusiven Expression des Gens CDH2 auf L-PA-6. Es kodiert für das Protein N-Cadherin<sup>22</sup> aus der Gruppe der Adhäsionskontakte<sup>23</sup>, welche für Zell-Zell-Kontakte

---

<sup>21</sup> auch CD49a genannt

<sup>22</sup> auch Cadherin-2 genannt

<sup>23</sup> engl. Adherens junctions oder lat. Fascia adherens

und Zell-Matrix-Verbindungen vor allem im kardialen Muskel wichtig sind. N-Cadherin stellt das Hauptprotein der Faszien im Herz und ihrer Differenzierung dar. Außerdem besteht eine Assoziation zwischen kardiomuskulären Adherens junctions und Gap junctions, welche sich im Laufe des Lebens ebenfalls stark anpassen und verschiedenartig ausprägen [105]. In einer Studie zu den Glanzstreifen des Herzmuskels, welche sich aus Adhäsionskontakten, Desmosomen und Gap junctions zusammensetzen, wurde N-Cadherin im frühen Stadium der Entwicklung als wichtiger Stabilitätsbaustein gefunden [89]. N-Cadherin interagiert intrazellulär mit den Cateninen und funktioniert Calcium-abhängig [106]. Die Ursache für die exklusive Expression dieses Zellkontaktgens in den Untersuchungen dieser Arbeit auf dem Laminin1-beschichtetem Substrat ist ungeklärt. Die These, dass Laminin die Stabilität der Endothelzellschicht über Induktion von Zell-Matrix-Verbindungen fördert und dadurch wiederum die Zell-Zell-Verbindungen gestärkt werden, könnte auch hier zugrunde liegen. Neue Erkenntnisse in der Zellphysiologie und neue Darstellungsmethoden scheinen zwingend erforderlich für ein besseres Verständnis des substratabhängigen kardiovaskulären TE.

### **4.2 Diskussion weiterer Ergebnisse anderer Forschungsgruppen**

Der aktuelle Stand der Forschung zeigt eine große Vielfalt an Ideen im TE von Herzklappenprothesen mit vielversprechenden Ergebnissen sowie auch ersten Limitationen in der Langzeitbeobachtung. Als geeignete Grundgerüste bilden sich dezellularisierte Herzklappen von Mensch oder Tieren und künstliche Polymerklappen heraus. Desweiteren werden die Methode der Zellularisierung, die Präkonditionierung im Bioreaktor, unterstützende Biofunktionalisierungen und die Zellquellen umfassend diskutiert.

#### **4.2.1 Aktuell diskutierte Grundgerüste und Zellquellen**

Dezellularisierte biologische Gerüste stellen mögliche, teils als optimal geltende Grundgerüste für moderne Herzklappen dar, zeigen aber durch die Dezellularisierung auch veränderte physikalische und mechanische Eigenschaften sowie freiliegende Kollagenfasern mit erhöhter Thrombogenität [107]. Optimierungen der azellulären Herzklappen werden aktuell vielseitig diskutiert [3][108][109]. Die physiologische Rezellularisierung der Implantate ist jedoch von den Dezellularisierungsprotokollen abhängig und erreicht häufig Grenzen [110]. Grundsätzliche Limitation bleibt bei dezellularisierten allogenen Grundgerüsten das Problem der Verfügbarkeit nativer

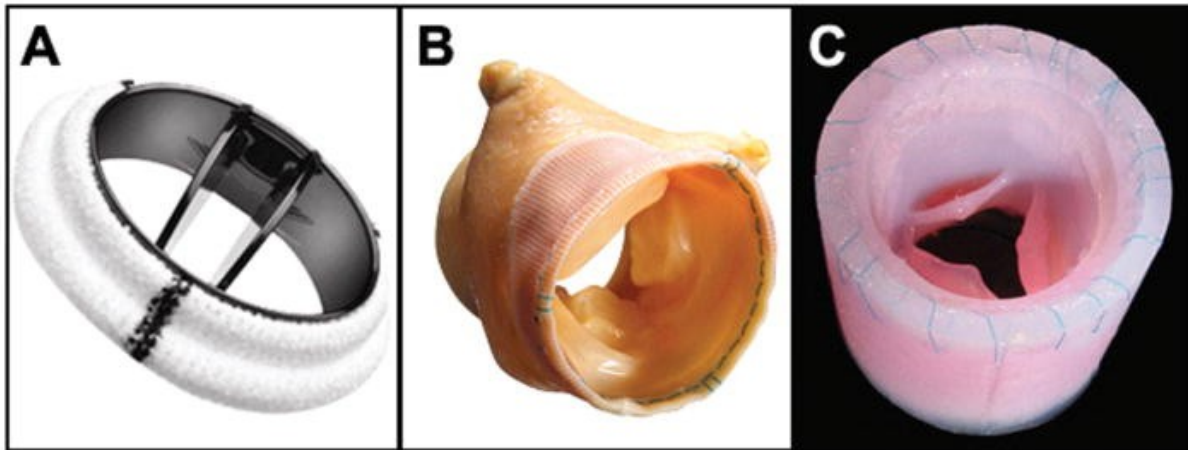
Materialien. In den letzten Jahrzehnten wurden die Erfolge und Fehlschläge von bereits klinisch angewandten dezellularisierten Prothesen wie SynerGraft®, einer dezellularisierten Schweineklappe, welche leider Langzeitversagen durch Kalzifizierung und Degeneration zeigte, untersucht [107][111]. Inzwischen ist die Translation in die Klinik für Homograft-basierte Klappenprothesen im Rahmen von klinischer Studien Realität geworden, wie Arbeiten von Tudorache et al., Sarikouch et al., Cebotari et al. und weitere Gruppen sowohl in Aorten- als auch Pulmonalklappenposition zeigen [112][113][114].

Dezellularisierte Homografts zeigen Wachstum und Regeneration bei Kindern. Auch die hämodynamischen Ergebnisse aus Studien mit implantierten Allografts erscheinen bereits adäquat. Wichtige Punkte sind jedoch weiterhin Entzündungsreaktionen und Thrombogenität von Grundgerüsten. Es besteht die Annahme, dass eine oberflächliche Endothelialisierung azellulärer Klappen zur Verminderung der Thrombogenität beiträgt und somit Langzeiterfolge sichern könnte [115][116].

Die Arbeitsgruppe um Klopsch et al. stellte dar, dass eine Präkonditionierung durch kurzzeitige physikalische oder chemische Verfahren von dezellularisierten SynerGraft® Prothesen eine mögliche Option zur Verbesserung der Rezellularisierung sein könnte [61]. Ist eine dezellularisierte Aorta mit ungeschützter extrazellulärer Matrix inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt, bildet sich eine pathologische Intimaproliferation ähnlich einer Artherosklerose. Eine Endothelialisierung vor Implantation soll die lange Reendothelialisierungszeit in vivo verkürzen und auf diese Weise Thrombose, Infektionen und Kalzifizierungen verhindern [46]. Allogene dezellularisierte Pulmonalklappenprothesen, welche mit autologen Endothelzellen rezellularisiert und bei einer Ross-Operation implantiert wurden, zeigten nach 10 Jahren exzellente hämodynamische Eigenschaften. Im Verlauf wurde ebenfalls eine Zunahme des Klappenanulusdurchmessers beobachtet, was für ein Mitwachsen der Klappe bei jungen Patienten spricht [114]. Die Prävention von Langzeitdegenerationen wird aktuell vermutet. Um die Ergebnisse zu vervollständigen, müssen weiterhin längere Zeiträume beobachtet werden. Nachteil dieser Prothesenherstellung ist das zusätzliche Kontaminationsrisiko durch einen Bioreaktor und die limitierte Verfügbarkeit allogener Klappen [117].

Neben den nativen und künstlichen Substraten existieren Untersuchungen zu weiteren vielversprechenden Grundgerüsten aus formbaren Strukturen wie beispielsweise Matrigel, eine besonders Laminin-1-reiche Matrix, Fibrin oder Kollagen im kardiovaskulären TE [96][89]. Diese gelartigen, bioresorbierbaren Strukturen bieten den Vorteil einer natürlichen Basis, zeigen jedoch bisher in Studien noch keine ausreichende mechanische Langzeitstabilität und -funktionalität [51][52].





**Abbildung 26: valvuläre Prothesenbeispiele**

Abbildung aus Zhang et al. [118]: Beispiele von Herzklappenprothesen: **A:** mechanische Herzklappe (Medtronic Open Pivot AP360®), **B:** Biologische Herzklappe (Freestyle® Aortic Root Bioprosthesis), **C:** Fibrin-basierte dreiflügelige Tissue Engineering Herzklappe (nach Flanagan et al.)

Die in-vitro Kreation von vitalem Herzklappenersatz, welcher eine lebenslange nativ-ähnliche in-vivo-Performance ohne Einschränkung zeigt, ist offensichtlich herausfordernd. Künstliche Substrate, welche häufig im 3D-Drucker oder mit Hilfe des Elektrosponningverfahrens produziert werden, stellen eine große Hoffnung dar. Die Gruppe von Dijkman et al. machte die in-vitro Produktion von implantierbaren dezellularisierten Klappen mithilfe von bioresorbierbaren synthetischen Materialien und autologen Zellen als Startermatrix möglich und umging damit die Probleme der sonst häufig auftretenden starken Fremdkörperreaktion nach der Implantation und die schnelle Klappenschrumpfung [119]. Dieses vielversprechende Konzept ist jedoch von der Verfügbarkeit biologischer Klappen und schwierig zu erreichender Zellen abhängig.

Synthetisches Gerüstmaterial weist viele Vorteile auf. Es ist reproduzierbar, günstig und stets fertig verfügbar. Für den Schritt in die Klinik als Therapieoption bestechen vor allem die prinzipiell kontrollierbaren chemischen und physikalischen Eigenschaften und Resorptionsraten. Bioresorbierbare Polymere, wie die Polycaprolactone werden derzeit als vielversprechende Grundmaterialien gesehen [4]. Idealerweise wird das künstliche Gerüst so hergestellt, dass die Degradation und Resorption im Körper der Rate von physiologischer Geweberegeneration und Wachstum entspricht, was sich aktuell als herausfordernd darstellt [47]. Nachteile der künstlichen bioresorbierbaren Gerüstmaterialien sind die möglichen toxischen Abbauprodukte und eine Inflamationsantwort in vivo [120]. Außerdem scheint eine funktionierende Kontaktfläche zwischen Zellen und Gerüstmaterial entscheidend für die Zellaktivität und das Zellüberleben bei künstlichen Prothesen zu sein [5].

Eine optimale Gefäß- oder Herzklappenprothese sollte es Zellen ermöglichen, ihre eigene extrazelluläre Matrix zu bilden und eine Proliferation sowie das Einwachsen in das Material zuzulassen. Auch die Struktur des Polymergrundgerüsts scheint von großer Bedeutung für die Zelladhäsion und die Stimulation der Zellen zu sein. In Untersuchungen mit Makrophagen konnte gezeigt werden, dass dickere und großporigere Prothesen die Zellinfiltration und die Bildung der extrazellulären Matrix verstärken [5]. Die Methode des Elektrosponning zur Herstellung moderner Materialien wird derzeit in verschiedenen Studien auf hämodynamische Eigenschaften der Prothesen und auf Eigenschaften der Zellen zur Bildung von extrazellulärer Matrix auf dem Material untersucht [77][121]. Vorteil der künstlichen Nanofaserstruktur durch das Elektrosponning ist die Ähnlichkeit zur nativen Faserstruktur im Gewebe [49].

Die klinische Translation steht den tissue-engineerten Herzklappenprothesen aus künstlichen bioresorbierbaren Materialien noch bevor, jedoch geben schon viele in-vivo Studien in Tiermodellen Hoffnung durch exzellente Ergebnisse nach Implantation. Häufig wird bereits der Einsatz von transkatheterbasierten Verfahren in Kombination mit modernen künstlichen Prothesen untersucht [43]. Schmidt et al. kombinierten ein Gerüst aus einem bioresorbierbaren Polymer mit autologen Zellen und ermöglichten durch Präkonditionierung im Bioreaktor eine funktionierende Prothese für 8 Wochen im Schafmodell. Es fand die Synthese von Proteinen statt, die mechanische Kraft der Klappe zeigte sich ausreichend, jedoch war die Flexibilität des Materials eingeschränkt [122]. Kluin et al. stellten eine fertig einsetzbare künstliche Prothese für den chirurgischen oder transkatheterbasierten Einsatz aus einem fibrösen Polymer her, welche über 12 Monate im Schaf gute Ergebnisse präsentierte [123].

Auf dem vaskulären Gebiet konnten bereits im klinischen Einsatz Gefäßprothesen aus einem Kopolymer mit autologen Knochenmarkszellen als eine Alternative ohne notwendige Antikoagulation für Kinder getestet werden. Es zeigten sich jedoch im Verlauf Stenosen mit notwendigen Erweiterungsinterventionen [124].

Zusammenfassend scheint ein einzelnes Grundgerüstmaterial, ob biologisch oder synthetisch, nicht die komplexen Aufgaben einer Herzklappe erfüllen zu können. Aus diesem Grund werden derzeit Studien mit Hybridklappen aus Materialkombinationen als eine neue Hoffnung gesehen, um zellphysiologische und mechanische Anforderungen gleichermaßen erfüllen zu können [53].

Auch die Wahl der Zellen für das kardiovaskuläre TE wird weiterhin die Forschung beschäftigen. Aktuell wird das Geburtsgewebe in vielen Studien untersucht. Endothelzellen aus der Nabelschnur zeigen sich bei in-vitro Experimenten immer wieder als gute Zellquellen für das kardiovaskuläre TE durch die Bildung von extrazellulärer Matrix. In einer Studie zur Entwicklung einer modernen Mitralklappenprothese wurde beim Einsatz von Zellen aus den Venen der Nabelschnur eine starke

Bildung von Kollagen und Elastin festgestellt [125]. Neben HUVECs wurden bei Untersuchungen zur Endothelialisierung von künstlichen Materialien von anderen Gruppen Zellen aus der Amnionflüssigkeit genutzt. Eine extrazelluläre Matrix wurde bei der Kombination mit den schnell bioabbaubaren Polymeren PGA und P4HB nach Kultivierung im Bioreaktor gefunden. Zellen der Amnionflüssigkeit zeigen sich demnach ebenfalls als vielversprechende Quelle pränatal, um suffiziente Prothesen generieren zu können [57]. In Untersuchungen mit dezellularisierten Gerüsten wurden auch mit Stammzellen gute Ergebnisse bei der Entwicklung von angepassten Ersatzklappen gesehen. Die Stammzellen könnten bei der Versorgung von künstlichem Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff helfen, was bisher als Problem galt [37].

Bei in-vitro Experimenten mit Klappen aus dem Polymer P4HB und einer Zellularisierung mit Myofibroblasten aus Nabelschnurzellen konnte eine biochemisch funktionierende extrazelluläre Matrix gefunden werden. Die konfluente Zellschicht sowie das Einwachsen in Poren wurden offensichtlich durch die Kultur im dynamischen Bioreaktor nach vorausgehender statischer Konditionierung unterstützt. Es fanden sich zusätzlich zur gelungenen Endothelialisierung adäquate mechanische Eigenschaften, womit gezeigt werden konnte, dass eine in-vitro-Produktion von vitalen und funktionalen Herzklappen mithilfe von Nabelschnurzellen auf Polymeren möglich ist. Bei intrauterin entdeckten Herzfehlern könnten somit Zellbanken mit Nabelschnüren ein großes Potential in Zukunft bieten. Der Langzeiterfolg dazu bleibt abzuwarten. Die verwendete Kryokonservierung der Zellen im Vorfeld ermöglicht die Nutzung der Endothelzellen zum idealen Operationszeitpunkt und macht so das angedachte *table-side*-Prinzip möglich [59].

### 4.2.2 Aktuell diskutierte Methoden des Tissue Engineering

In der aktuellen Entwicklung von Herzklappenprothesen werden häufig die Vorteile einer Präkonditionierung im Bioreaktor diskutiert und in Studien bestätigt. Unter dynamischen Bedingungen in-vitro zeigen sich bei der Kultivierung von Klappenprothesen nach 14 Tagen signifikant bessere mechanische Eigenschaften mit einer stärkeren Matrixproduktion als unter statischen Bedingungen [80]. Die Zelladhäsion wird verstärkt und die extrazelluläre Matrix verändert, sodass eine Optimierung der dynamischen Bedingungen an die nativen Verhältnisse zu weiteren Erfolgen führen könnte [51]. Auch für das Einwachsen von Zellen in bioresorbierbare Polymere wurde ein Vorteil unter Flussbedingungen festgestellt [59]. Durch eine Scherstress-Simulation bei in-vitro Studien wurde die Ausbildung von Adhäsionskontakten bei HUVECs auf Laminin-1-Substraten gefunden. Endothelzellen können als Mechanosensor für Veränderungen im Blutfluss agieren und somit unter anderem auch den Durchmesser von Gefäßen steuern. Über fokale Adhäsionskontakte

scheint eine Kommunikation und intrazelluläre Genregulation statt zu finden, was erneut die Bedeutung der Zellverbindungen und ihrer Adaptationsfähigkeiten hervorhebt [32].

Eine dynamische Präkonditionierung im Bioreaktor stellt in vielen Untersuchungen einen Vorteil dar, geht aber auch mit Nachteilen wie erhöhtem Kontaminationsrisiko einher. Die positiven Ergebnisse bestätigen die These, dass der Körper selbst als in-vivo-Reaktor beim *table-site*-Prinzip zur Herstellung individuell angepasster Implantate dienen könnte. Dies wird auch als *guided tissue regeneration*<sup>24</sup> bezeichnet und setzt auf eine zelluläre Besiedelung durch den Empfängerorganismus nach der Implantation [47]. Dabei muss die Prothese so entwickelt sein, dass die Zellen zur Rezellularisierung „geleitet“ werden. Diese Idee wurde bereits von der Gruppe um Nakayama bei Untersuchungen zu einer im Körper entwickelten Herzklappe aufgegriffen und zeigte sich zunächst erfolgreich. Die funktionelle Langzeitperformance einer solchen in-vivo Produktion muss in Zukunft untersucht werden [126].

Dieser Ansatz wird auch beim *Off-the-shelf*<sup>25</sup>-Verfahren verwendet, welches sich durch die schnelle Entwicklung im TE als kostenreduzierende Alternative und zur Umgehung der in-vitro-Hürden entwickelt hat und aktuell im Vergleich mit dem *Patient-specific*<sup>26</sup>-Verfahren diskutiert wird. Beim *Off-the-shelf*-Verfahren wird ein anpassungsfähiges, zellfreies Grundgerüst gestellt, welches im Körper Zellen rekrutieren soll. Hierbei ist keine Präkonditionierung notwendig, die Prothesen können direkt verwendet werden. Die Hoffnung auf eine funktionale regenerative Klappe soll hierbei durch Entwicklungen in der Zellumgebungsmodellierung unterstützt werden [43]. Zu diesem Ansatz werden beispielsweise die dezellularisierten Gerüste gezählt (siehe dazu 4.2.1). Von Driessen-Mol et al. wurde eine fertig produzierte tissue-engineerte Herzklappe für den katheterbasierten Einsatz in einer Langzeitstudie an Schafen getestet. Eine signifikante Matrixmodellierung sowie eine Repopularisierung und Endothelialisierung fand statt. Nach anfänglicher adäquater Funktionalität zeigten die Langzeitergebnisse Regurgitationen und Undichtigkeiten [127]. Ebenso zeigten Emmert et al. eine ein-Schritt-Intervention durch die Kombination von transkatheterbasierter Intervention und einem bioresorbierbaren synthetischen Grundgerüst mit autologen Stammzellen. Die zweiwöchigen Ergebnisse im Schafmodell zeigten adäquate hämodynamische Funktionen und eine gute Zellularisierung. Die Langzeitanalysen für diese Methode sind noch ausstehend [128].

Das *Patient-specific*-Verfahren setzt auf eine individuelle, patientenspezifische Medizin und ist im Vergleich zum bereits eingesetzten *Off-the-shelf*-Verfahren eine große Hoffnung für jüngere Patienten in der weiteren Zukunft. Hierbei sollen die Nachteile, wie Kostenaufwand und

---

<sup>24</sup> =geleitete Geweberegeneration

<sup>25</sup> = aus dem Schrank

<sup>26</sup> = patientenspezifisch

Kontaminationsgefahr der in-vitro Produktion von Prothesen in Kauf genommen werden, um die Chance auf regenerative, mitwachsene Herzklappen für die Patienten zu erhöhen. Als Methoden werden hierbei dreidimensionale Druckverfahren und computerbasierte Modellierungshilfen verwendet. Häufig werden individuelle Hybridmaterialien diskutiert.

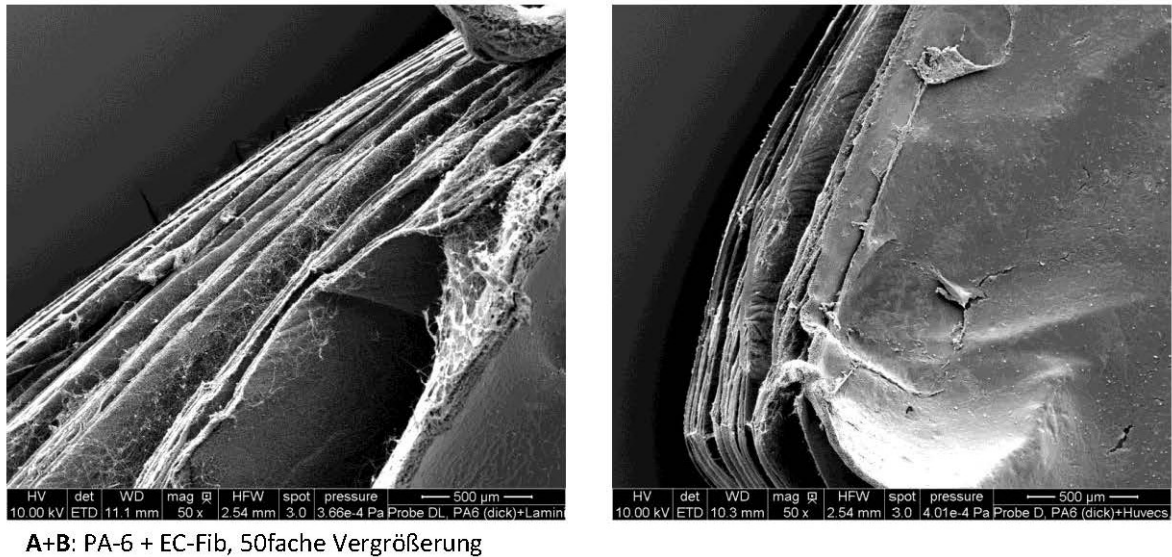
Eine Kombination beider Ansätze ist für die Zukunft denkbar sowie auch die Kombination verschiedener Biomaterialien im kardiovaskulären TE immer beliebter wird. Durch Hybridklappen besteht die Hoffnung, die Defizite einzelner Materialien zu eliminieren [53].

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich die Entwicklung des kardiovaskulären TE dynamisch schnell vollzieht, der ideale Herzklappenersatz jedoch noch nicht gefunden werden konnte. Aktuell sind dezellularisierte allogene Klappen eine vielversprechende Matrix, wobei die in-vitro Endothelialisierung vermutlich den minimal verpflichtenden Aufwand darstellt. Eine Anlockung der Zellen in-vivo über Zytokine oder diverse Beschichtungen der Oberfläche ist denkbar. Für die pädiatrische Herzchirurgie bieten sich künstliche bioresorbierbare Materialien an, welche im Langzeitverlauf durch Zellen ersetzt werden sollten. Bezogen auf die Abbauraten und Porosität von künstlichen Materialien muss eine Balance zwischen der verbesserten Zelladhäsion an porösen Materialien und der mechanischen Stabilität gefunden werden. Ein tiefer gehendes Verständnis der Zell-Matrix-Interaktionen und verbesserte Materialkenntnisse werden in den nächsten Jahren das kardiovaskuläre TE vorantreiben [3].

### 4.3 Grenzen der Untersuchungen und Ausblick

Jede Form von Untersuchung ist in bestimmten Bereichen begrenzt und erreicht Einschränkungen, die an anderer Stelle überwunden werden müssen. Da in diesem Versuchsansatz eine eigenständige experimentelle Tätigkeit mit vielen Etablierungsarbeiten zugrunde lag, mussten die Probenanzahlen teilweise eingeschränkt werden. Die Arbeit wurde entsprechend vorrangig auf qualitative Analysen fokussiert. Die Materialeinschränkungen beziehen sich primär auf die für den Versuchsansatz notwendige, vor Ort noch neuartige Produktion der elektronisch gesponnenen Vliese aus Polymerfasern des IBMT und die eigenhändige Gewinnung der frisch isolierten Endothelzellen aus Nabelschnüren. Der Wunsch nach dickeren Polymervliesen als Anpassung an die native Klappendicke stellte sich in diesem Versuchsansatz als nicht umsetzbar dar, da die Polymervliese mit steigender Dicke eine Lagenbildung mit Delaminierung bildeten, wie sich im Verlauf herausstellte (siehe Abbildung 27). Dies zeigte sich bei einer Charge mit dicker gesponnenen Vliesen aus PA-6, wodurch

nicht nur die mechanischen Eigenschaften zu hinterfragen waren, sondern auch die Zelldichteanalysen methodisch nicht möglich waren.



**Abbildung 27: Limitation durch delaminiertes PA-6**

Rasterelektronenmikroskopaufnahme PA-6 + EC-Fib, 50fache Vergrößerung zur Darstellung der Delaminierung bei dicker gesponnenen Folien

Dicker gesponnene Folien ohne Delaminierung wären wünschenswert, da die Vorteile zum Einen eine höchstwahrscheinlich bessere Anpassung an mechanische Eigenschaften des Nativmaterials und zum Anderen eine leichtere Handhabung während der histologischen Verfahren wären. Das Elektrosponningverfahren des IBMT wird in Zukunft weiter ausgebaut. Auch aus anderen Arbeitsgruppen ist bekannt, dass dickere Scaffolds aus Polymeren, vermutlich aufgrund einer höheren Stabilität und Festigkeit und besserer Steuerbarkeit der Porosität, ein bevorzugtes Substrat für die Zellproliferation darstellen [76].

Auch die histologischen Untersuchungen der zellularisierten Polymervliese zeigten einige Herausforderungen, da die üblichen Analysemethoden des Labors nicht auf die untersuchte Kombination aus sehr feinen Polymervliesen und HUVECs anwendbar waren. Aufwendige Etablierungen und nachfolgende Standardisierungen von Färbungen und anderen Methoden waren notwendig. Beispielsweise zeigte sich das Erstellen von Gewebeschnitten erschwert durch die Feinheit und schlechte Sichtbarkeit der Polymerfolien im Tissue Tek. Auf den einfachen Objektträgern ohne zusätzliche Beschichtung fand zunächst kein Anhaften statt, dies wurde durch die Nutzung von speziell beschichteten Objektträgern (Menzel-Gläser Superfrost®Plus, Thermo Fisher

Scientific (Waltham, USA)) als Standard minimiert. Das Eindecken zerstörte oft die feinen Fasern, daher wurde für die Zelldichteuntersuchungen eine Färbung mit inkludiertem Eindeckmedium (VECTASHIELD mounting medium for fluoreszenz with DAPI, VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)) etabliert. Waschschrte mussten stets sehr vorsichtig durchgeführt werden. In der Mikroskopie zeigte vor allem PA-6 eine starke Eigenfluoreszenz und eine starke Anfärbung durch den Farbstoff NovaRed (VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)). Daher war es notwendig, die Zellzahlergebnisse der Fluoreszenzfärbung mit der *Hematoxylin Quickstaining*-Färbung ((VECTOR Laboratories (Burlingame, USA)) zu überprüfen. Teilweise aggregierten Protein-Farbstoff-Komplexe während der immunhistologischen Untersuchungen. Dies könnte an der Struktur der Basalmembrankomponenten liegen. Diese sind typischerweise große Oligomere, welche Netzwerke bilden. Die Analyse mit klassischen Methoden gestaltet sich daher häufig herausfordernd, da die Proteine aufgrund ihrer Funktionen zum akkumulieren neigen und wenig löslich sind [32].

Durch die aufwendige Etablierung der Methoden waren die Stückzahlen der Einzeluntersuchungen eingeschränkt. Quantitative Analysen wurden entsprechend für die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften, die Zelldichte-Messungen sowie für die Genexpression als Tendenzen dargestellt. Unterschiede in der Basalmembranentwicklung zwischen den Polymersubstraten wurden primär durch qualitative Analysen mit detailliertem Bildmaterial herausgestellt. Die Mechanismen der Endothelialisierung und Basalmembranorganisation wurden immunhistologisch fokussiert analysiert. Ein tieferes Eindringen in die Zellphysiologie mithilfe weiterer qRT-PCR-Untersuchungen der Zellverbindungsproteine erscheint sinnvoll. Die durchgeführten Zellverbindungsanalysen lassen Fragen zur Substratspezifität offen. Die unterschiedliche Genexpression für die Desmosomenproteine stellt beispielsweise einen interessanten Punkt für weitere Untersuchungen dar.

Eine weitere klare Einschränkung dieser Arbeit ist das Fehlen von in-vitro dynamischen und in-vivo Experimenten, um die physiologische Endothelialisierung kardiovaskulärer Implantate weiter zu verstärken. Dynamische Durchflussuntersuchungen könnten den positiven Effekt der physiologischen Strömung auf die Entwicklung der Endothelialisierung aufzeigen oder eventuelle Einschränkungen der tissue-engineerten Polymer-HUVECs-Substrate unter dynamischen Bedingungen aufdecken. Unter den Flussbedingungen könnte die Stabilität der von uns genutzten Lamininbiofunktionalisierung getestet werden. Die durchgeführten Analysen zeigten die Vitalität der ausgesäten Zellen auf allen Grundsubstraten, jedoch konnte auch die Unreife der Endothelialisierung und der Basalmembranentwicklung auf allen Materialien mit substratspezifischen Unterschieden gesehen werden. Die fehlende Dynamik während der Kultur könnte eine Ursache für die Unreife der Strukturen sein. Für die Gestaltung neuartiger Herzklappengerüste spielen multiple, teilweise noch unbekannte Faktoren eine Rolle, die noch weiterer Forschung bedürfen. Von Flanagan et al. und Liu

et al. wurde die Wichtigkeit einer gesunden, physiologisch entwickelten dreidimensionalen Zell-Matrix-Organisation in Herzklappenprothesen herausgestellt und die Rolle von den Zellen des Interstitiums für das Gewebe und die physiologische Anpassung an Umgebungsveränderungen wie Strömungen betont [92, 93].

Eine kovalente Bindung des Glykoproteins Laminin-1 an die Polymerverbindungen der Vliese, eventuell mithilfe einer plasmatischen Aktivierung der Polymervliesoberfläche, stellt ebenfalls eine untersuchungswürdige Erweiterung des Konzeptes dar. In aktuellen Studien wird weiter an Oberflächenfunktionalisierungen für eine verbesserte Zelladhäsion geforscht. Es konnten optimierte Bedingungen für die Adhäsion auf Polymergrundsubstraten durch eine Plasmaoberflächenaktivierung mit funktionellen Gruppen und durch bindungsselektive Antikörper festgestellt werden [100, 129]. Außerdem sind Vergleiche von Beschichtungen der Polymervliese mit weiteren Basalmembranproteinen wie Fibronectin oder Kollagen denkbar. Das kleine Molekül Entaktin, auch als Nidogen bezeichnet, spielt für die Zell-Matrix-Interaktion und die Verknüpfung zwischen Laminin und Kollagen Typ IV eine Rolle und könnte daher für weitere Analysen interessant sein [29].

Die unterschiedlichen Zellarten für die Nutzung als Oberflächenschicht auf künstlichen Gerüsten sind zu diskutieren. Ein denkbare Alternative zu den HUVECs und weiteren Geburtsgewebszellen ist die Nutzung von valvulären Endothelzellen [130]. Hier ist jedoch die Verfügbarkeit humaner Zellen die limitierende Herausforderung.

Das entwickelte Konzept der gesprühten Zellaussaat hat seinen Vorteil in der prinzipiell denkbaren Möglichkeit nach den Laboranalysen die Adaption in die Operationssäle als table-site-Methode zu schaffen und könnte somit zu einer langfristig ressourcenschonenden Forschungsweise führen. Weitere Schritte sind die Entwicklung einer dreidimensionalen Klappe aus den untersuchten Polymervliesen, sowie deren Einsatz unter Flussbedingungen und eine längere Kulturzeit.

Die durchgeführte Arbeit erweitert das immer noch inkomplette Basiswissen über Mechanismen der Zelladhäsion und physiologischer Basalmembranentwicklung an der Übergangszone zwischen Zellen und Gerüstmaterial. Die Einschränkungen dieser Arbeit können höchstwahrscheinlich in der Zukunft durch weitere Methodenoptimierungen überwunden werden.



## 5. Zusammenfassung und Thesen

### 5.1 Zusammenfassung

Die große Herausforderung unserer Zeit auf dem Gebiet des Herzklappenersatzes liegt darin, eine ideale Prothese zu finden. Diese sollte funktionell die nativen Herzklappen dauerhaft ersetzen können, den Körper nicht durch Thrombogenität, Immunantworten oder Toxizität belasten, idealerweise mitwachsend sein und sich den individuellen Herausforderungen anpassen können. Diese Arbeit fokussierte sich auf das kardiovaskuläre TE und untersuchte unterschiedliche Polymervliese, welche durch das Elektrosponningverfahren hergestellt wurden, mit einer Besiedelung aus humanen endothelialen Zellen der Nabelschnurvene. Mechanische Untersuchungen der Polymervliese aus Polyamid-6 (PA-6), Poly-L-Lactid (PLLA) und Poly-E-Caprolactone (PCL) wurden von einem Partnerlabor auf die Vergleichbarkeit mit nativem kardiovaskulärem Material vom Schwein vor und nach der Zellularisierung durchgeführt. Es wurde ein standardisiertes Sprühverfahren mit einem Fibringel zur Aussaat der endothelialen Zellen auf den Oberflächen der Grundsubstrate verwendet. Ein weiterer Fokus der Untersuchungen war die Oberflächenmodifikation des Substrates PA-6 mit dem Glykoprotein Laminin-1 vor Zellaussaat. Die zellularisierten Polymervliese wurden statisch kultiviert und nach 24 Stunden sowie nach 14 Tagen auf Zellvitalität und Basalmembranbildung mit histologischen Verfahren, dem REM und der qRT-PCR untersucht.

Die Ergebnisse präsentierten auf allen Präparaten über den Zeitraum ein Überleben der Endothelzellen mit linearer Zellausrichtung sowie die beginnende Ausbildung einer Basalmembran an der Übergangsfläche zwischen Zellen und Grundgerüst. Die Oberflächenbiofunktionalisierung mit Laminin-1 zeigte die Tendenz einer geringfügigen Verstärkung des Endothelialisierungsprozesses mit moderaten Anpassungen der Genexpression für Basalmembranproteine auf dem Substrat PA-6. Insgesamt erschien die Basalmembranentwicklung jedoch auf allen Polymeren noch unreif und substratabhängig.

Bei den mechanischen Untersuchungen konnte gesehen werden, dass sich die Substratsteifigkeit sowohl durch die Zellbesiedelung, als auch durch die Beschichtung mit Laminin verringert. Keines der untersuchten Materialien erreichte jedoch vor oder nach Kultivierung die mechanische Funktionalität der nativen Materialien, welche eine grundlegende Basis für die erfolgreiche Prothesenentwicklung darstellt.

Das verwendete Konzept der direkt gesprühten Zell-Fibrin-Komponente auf Prothesenmaterialien stellt eine Technik dar, welche prinzipiell von den Laboren in die Operationssäle übernommen werden könnte. Für das ergänzende Fortführen der Untersuchungen könnten sich in-vitro

dynamische und in-vivo Experimente anschließen, um den Einfluss der Endothelialisierung auf Klappenstruktur und -funktion weiter zu analysieren. Ein weiterer Schritt könnte die Entwicklung einer stabilen dreidimensionalen Herzklappenprothese aus den elektronisch gesponnenen Fasern sein, welche möglichst geringe Abweichungen vom biologischen Vorbild in den physikalischen Untersuchungen zeigt. Für die Zukunft des kardiovaskulären TE ist das tiefere Eindringen in das zellphysiologische Verständnis bezüglich der Basalmembran und der Endothelialisierungsprozesse zwingend erforderlich. Die Proteine der Basalmembran bilden die Schlüsselemente für eine gelungene Zelladhäsion und könnten durch Oberflächenmodifikationen künstlicher Substrate genutzt werden. Wie die aktuelle Forschung zeigt, bildet eine ausgereifte Endothelzellschicht mit guter Adhäsion auf dem Grundgerüst neben der mechanischen Funktionalität die wichtigste Grundlage für den Langzeiterfolg der TE-Prothesen im kardiovaskulären Einsatz.

### 5.2 Thesen

1. Ein Ziel dieser Arbeit war die Prüfung von Machbarkeit und Effektivität einer Zellularisierung aus Endothelzellen der Nabelschnurvene auf künstlichen Substraten aus Polymernanofasern zur Herstellung von Klappengerüsten. Dabei erhielt die endotheliale Grenzfläche zum Gerüstsubstrat einen besonderen Fokus. Desweiteren wurde das Konzept der direkten Endothelzell-plus-Fibrin-Aussaat unter Einsatz einer gesprühten Zellapplikationstechnik und Laminin-1-Biofunktionalisierung der Grundgerüste auf prinzipielle Umsetzbarkeit geprüft, sodass vergleichsweise einfach im kardiovaskulären Operationssaal mit dem *table-side*<sup>27</sup>-Verfahren zellularisierte Klappenprothesen während einer laufenden Herzklappenoperation hergestellt werden könnten.
2. Für eine suffiziente Langzeitperformance von Herzklappenprothesen ist grundlegende Bedingung, dass sich die physikalischen Eigenschaften künstlicher Materialien der Funktionalität nativer Herzklappen in mechanischen Belastungstests annähern.
3. Untersuchte Vliestreifen der künstlichen Polymere Polyamid-6 (PA-6), Poly-L-Lactid (PLLA) und Poly-E-Caprolactone (PCL) kamen in mechanischen Belastungstests noch nicht an den physiologischen Kurvenverlauf von nativen Herzklappen heran und neigten zu starker Überdehnung, wohingegen native Schweineherzklappen ab einem bestimmten Belastungslevel rissen. Native Pulmonalklappen vom Schwein zeigten in uniaxialen Belastungstests eine höhere Steifigkeit als Aortenklappen.

---

<sup>27</sup> =neben dem Tisch, gemeint ist der Operationstisch

4. Endothelialisierung und Oberflächenfunktionalisierung mit Laminin-1 setzten die Substratsteifigkeit der künstlichen Polymermaterialien PA-6, PLLA und PCL in mechanischen Belastungstests herab.
5. Ein idealer Herzklappenersatz sollte mechanisch suffiziente Eigenschaften zeigen, keine Thrombogenität und Immunogenität aufweisen und sich den Umgebungsbedingungen anpassen können. Moderne Tissue Engineering-Verfahren versuchen durch Kombination von Gerüstsubstraten mit physiologischen Oberflächen dieses Ziel zu erreichen. Physiologische Bedingungen während der Entwicklung scheinen den Erfolg der Prothesen im hämodynamischen Einsatz zu verstärken.
6. Die Nabelschnur stellt eine geeignete Quelle für schnellwachsende Endothelzellen zur vitalen Endothelialisierung von künstlichen Polymeroberflächen beim kardiovaskulären Tissue Engineering dar.
7. Feine Vliese aus elektronisch gesponnenen Polymerfasern erfordern besondere Vorsicht bei analytischen Verfahren. Für histologische Querschnitte mit der Kryoschnitttechnik bieten sich beschichtete Objektträger und ein Färbeverfahren mit integriertem Eindeckmedium an. Das Polymer Polyamid-6 zeigte eine starke Eigenfluoreszenz und Eigenanfärbung bei histologischen Untersuchungen.
8. Nach der Zellbesiedelung der Polymere PA-6, PLLA und PCL mit Endothelzellen der Nabelschnur und 24stündiger sowie 14tägiger Kultivierung in Endothelzellmedium zeigte sich eine vitale Endothelialisierung der Polymeroberflächen mit primär linearer Zellausrichtung auf allen drei Materialien und eine partielle physiologische Basalmembranbildung mit Synthese der Proteine Laminin, Fibronectin, Integrin und Kollagen Typ IV.
9. Eine Oberflächenfunktionalisierung von elektronisch gesponnenem Polyamid-6 mit Laminin-1 zeigte in den durchgeführten Versuchen die Tendenz einer moderaten Verstärkung der Genexpression für die Basalmembranproteine Laminin, Fibronectin, Integrin und Kollagen Typ IV im Vergleich mit Polyamid-6 ohne Biofunktionalisierung.
10. Die Genexpression für spezifische Basalmembranproteine der Zelladhäsion und der Zell-Zell-Verbindungen durch Endothelzellen erfolgte auf den Substraten PLLA, PA-6 und mit Laminin-1 beschichtetem PA-6 (L-PA-6) substratspezifisch. Es fanden sich Unterschiede in der Genexpression von Desmosomen sowie in der Integrin- und Cadherin-Gruppe. Eine Oberflächenbeschichtung mit Laminin-1 auf Polyamid-6 scheint zu einer Beeinflussung der Integrin- und Cadherinsynthese von Endothelzellen zu führen.
11. Auf dem Substrat PLLA wurde in den durchgeführten Untersuchungen die Entwicklung von Desmosomen durch die Endothelzellen gefördert, wohingegen sie auf dem Substrat PA-6 unabhängig von einer Laminin-1-Oberflächenbeschichtung gehemmt wurde.

12. Für eine erfolgreiche Endothelialisierung von Prothesenoberflächen im kardiovaskulären Einsatz ist eine physiologische Basalmembranentwicklung an der endothelialen Übergangsfläche zwischen Zellen und Gerüstmaterial unabdingbar.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Kvidal P, Bergström R, Malm T, Ståhle E. Long-term follow-up of morbidity and mortality after aortic valve replacement with a mechanical valve prosthesis. *Eur. Heart J.* 2000;21:1099–111. doi:10.1053/euhj.2000.1862.
2. Mayer JE. In search of the ideal valve replacement device. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001;122:8–9. doi:10.1067/mtc.2001.115926.
3. Klopsch C, Steinhoff G. Tissue-engineered devices in cardiovascular surgery. *Eur Surg Res.* 2012;49:44–52. doi:10.1159/000339606.
4. Pfeiffer D, Stefanitsch C, Wankhammer K, Müller M, Dreyer L, Krolitzki B, et al. Endothelialization of electrospun polycaprolactone (PCL) small caliber vascular grafts spun from different polymer blends. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102:4500–9. doi:10.1002/jbm.a.35123.
5. Wang Z, Cui Y, Wang J, Yang X, Wu Y, Wang K, et al. The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration. *Biomaterials.* 2014;35:5700–10. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.078.
6. Netter FH, Stauch M, Yonkman FF, editors. *Herz.* 3rd ed. Stuttgart: Thieme; 1990.
7. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *Innere Organe: 118 Tabellen.* 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2009.
8. Steffel J, Lüscher TF. *Herz-Kreislauf.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
9. Schmidt RF, Lang F. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie.* 30th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007.
10. Schoen FJ. Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement. *Cardiovasc. Pathol.* 2005;14:189–94. doi:10.1016/j.carpath.2005.03.005.
11. Drenckhahn D, Asan E, Benninghoff A, Benninghoff-Drenckhahn, editors. *Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut.* 16th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2004.
12. Welsch U, Deller T, Kummer W. *Lehrbuch Histologie: Mit 49 Tabellen.* 4th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2014.
13. Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Bärwolf C, Hanrath P, Horstkotte D, Koch KC, et al. Klappenvitien im Erwachsenenalter. *Clin Res Cardiol.* 2006;95:620–41. doi:10.1007/s00392-006-0458-8.
14. Braunwald E. Adventures in cardiovascular research. *Circulation.* 2009;120:170–80. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.860965.
15. Schmid C. *Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie.* 3rd ed. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2014.

16. Eppinger M, Müller M. Pädiatrie: Für Studium und Praxis ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen ; 2013/14. 1st ed. Breisach am Rhein: Medizinische Verl.- und Informationsdienste; 2013.
17. Jockenhoevel S, Flanagan TC. Tissue-Engineered Heart Valves: An Alternative Solution for Pediatric Patients. *Congenital Cardiology Today*. 2008;1–7.
18. Hufnagel CA, Harvey WP, Rabil PJ, McDermott TF. Surgical correction of aortic insufficiency. *Surgery*. 1954;35:673–83.
19. Dominik J, Žáček P. Heart valve surgery: An illustrated guide. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010.
20. Harken DE, Soroff HS, Taylor WJ, Lefemine AA, Gupta SK, Lunzer S. Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1960;40:744–62.
21. Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet*. 1962;2:487.
22. Braunwald E. Aortic valve replacement: an update at the turn of the millennium. *Eur. Heart J*. 2000;21:1032–3. doi:10.1053/euhj.1999.2052.
23. Funkat A, Beckmann A, Lewandowski J, Frie M, Ernst M, Schiller W, et al. Cardiac surgery in Germany during 2013: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;62:380–92. doi:10.1055/s-0034-1383430.
24. Beckmann A, Funkat A-K, Lewandowski J, Frie M, Schiller W, Hekmat K, et al. Cardiac surgery in Germany during 2012: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;62:5–17. doi:10.1055/s-0033-1361953.
25. Beckmann A, Funkat A-K, Lewandowski J, Frie M, Ernst M, Hekmat K, et al. German Heart Surgery Report 2016: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;65:505–18. doi:10.1055/s-0037-1606603.
26. Wintermantel E, Ha S-W. Medizintechnik: Life Science Engineering ; Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business. 5th ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009.
27. Roumieh M, Ius F, Tudorache I, Ismail I, Fleissner F, Haverich A, Cebotari S. Comparison between biological and mechanical aortic valve prostheses in middle-aged patients matched through propensity score analysis: long-term results. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014. doi:10.1093/ejcts/ezu392.
28. Alberts B, Nover L. Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
29. Nerlich A. Morphologie von Basalmembran- und assoziierten Matrixproteinen in normalem und pathologischem Gewebe: Mit 17 Tabellen = Morphology of basement membrane and associated matrix proteins in normal and pathological tissues. Stuttgart: Fischer; 1995.
30. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002;115:3861–3.

31. Barber T, Esteban-Pretel G, Marín MP, Timoneda J. Vitamin a deficiency and alterations in the extracellular matrix. *Nutrients*. 2014;6:4984–5017. doi:10.3390/nu6114984.
32. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* 2005;85:979–1000. doi:10.1152/physrev.00014.2004.
33. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 1979;254:9933–7.
34. Timpl R, Brown JC. The laminins. *Matrix Biol.* 1994;14:275–81.
35. Li S, Harrison D, Carbonetto S, Fassler R, Smyth N, Edgar D, Yurchenco PD. Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J. Cell Biol.* 2002;157:1279–90. doi:10.1083/jcb.200203073.
36. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell Biol.* 1988;107:1589–98.
37. Haverich A. Tissue Engineering in der Herzchirurgie. *Chirurg.* 2011;82:293–4. doi:10.1007/s00104-011-2085-9.
38. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann. Thorac. Surg.* 1995;60:S513-6.
39. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation.* 2000;102:III50-5.
40. Haverich A. Cardiac tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34:227–8. doi:10.1016/j.ejcts.2008.05.013.
41. Kaminski A, Klopsch C, Mark P, Yerebakan C, Donndorf P, Gäbel R, et al. Autologous valve replacement-CD133+ stem cell-plus-fibrin composite-based sprayed cell seeding for intraoperative heart valve tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17:299–309. doi:10.1089/ten.tec.2010.0051.
42. Klopsch C, Gäbel R, Kaminski A, Mark P, Wang W, Toelk A, et al. Spray- and laser-assisted biomaterial processing for fast and efficient autologous cell-plus-matrix tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2012. doi:10.1002/term.1657.
43. Fioretta ES, Boehmer L von, Motta SE, Lintas V, Hoerstrup SP, Emmert MY. Cardiovascular tissue engineering: From basic science to clinical application. *Exp Gerontol* 2018. doi:10.1016/j.exger.2018.03.022.
44. Breymann C, Schmidt D, Hoerstrup SP. Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering. *Stem Cell Rev.* 2006;2:87–92. doi:10.1007/s12015-006-0014-y.

45. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1998;14:279–84.
46. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, et al. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation*. 2002;106:163–168.
47. Goecke T, Tudorache I, Hilfiker A, Haverich A, Cebotari S. Präfabrikation von Herzklappen. *Chirurg* 2015. doi:10.1007/s00104-014-2831-x.
48. Klopsch C, Donndorf P, Kaminski A, Ma N, Steinhoff G. Zellquellen für kardiovaskuläres Tissue Engineering. *Chirurg*. 2011;82:295–302. doi:10.1007/s00104-010-2030-3.
49. Hinderer S, Seifert J, Votteler M, Shen N, Rheinlaender J, Schäffer TE, Schenke-Layland K. Engineering of a bio-functionalized hybrid off-the-shelf heart valve. *Biomaterials*. 2014;35:2130–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.10.080.
50. Schmidt D, Stock UA, Hoerstrup SP. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci*. 2007;362:1505–12. doi:10.1098/rstb.2007.2131.
51. Flanagan TC, Cornelissen C, Koch S, Tschoeke B, Sachweh JS, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S. The in vitro development of autologous fibrin-based tissue-engineered heart valves through optimised dynamic conditioning. *Biomaterials*. 2007;28:3388–97. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.012.
52. Flanagan TC, Sachweh JS, Frese J, Schnöring H, Gronloh N, Koch S, et al. In vivo remodeling and structural characterization of fibrin-based tissue-engineered heart valves in the adult sheep model. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:2965–76. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0018.
53. Nachlas ALY, Li S, Davis ME. Developing a Clinically Relevant Tissue Engineered Heart Valve-A Review of Current Approaches. *Adv Healthc Mater* 2017. doi:10.1002/adhm.201700918.
54. Guldner NW, Jasmund I, Zimmermann H, Heinlein M, Girndt B, Meier V, et al. Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering. *Circulation*. 2009;119:1653–60. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.823948.
55. Massia SP, Hubbell JA. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res*. 1991;25:223–42. doi:10.1002/jbm.820250209.
56. Sultana N, Hassan MI, Lim MM. Composite synthetic scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine: Springer International Publishing; 2015.



57. Schmidt D, Achermann J, Odermatt B, Breymann C, Mol A, Genoni M, et al. Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source. *Circulation*. 2007;116:164-70. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.681494.
58. Weber B, Zeisberger SM, Hoerstrup SP. Prenatally harvested cells for cardiovascular tissue engineering: fabrication of autologous implants prior to birth. *Placenta*. 2011;32 Suppl 4:S316-9. doi:10.1016/j.placenta.2011.04.001.
59. Sodian R, Lueders C, Kraemer L, Kuebler W, Shakibaei M, Reichart B, et al. Tissue engineering of autologous human heart valves using cryopreserved vascular umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg*. 2006;81:2207–16. doi:10.1016/j.athoracsur.2005.12.073.
60. Gstraunthaler G, Lindl T. Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 7th ed. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
61. Klopsch C, Ludwig M, Skorska A, Zacher L, Jerke M, Luderer F, et al. Direct sprayed endothelialization, basement membrane and cell junction development on biological and artificial products are highly substrate-dependent and require optimized biofunctionalization. *BioNanoMaterials* 2015;16(1):285-99. doi:10.1515/bnm-2015-0010.(De Gruyter database; ISSN 2193-066X)
62. Wallace GG, Higgins MJ, Moulton SE, Wang C. Nanobionics: the impact of nanotechnology on implantable medical bionic devices. *Nanoscale*. 2012;4:4327–47. doi:10.1039/c2nr30758h.
63. Yao J., Bastiaansen C.W.M. and Peijs T. (2014). High Strength and High Modulus Electrospun Nanofibers. *Fibers*. 2, 158-187. 2014.
64. Arbeiter D, Grabow N, Sternberg K, Schmitz K-P. Influence of HDI Fixation on the Mechanical Properties of Porcine Pericardial Tissue for Heart Valve Engineering. *Biomed Tech (Berl)* 2013. doi:10.1515/bmt-2013-4095.
65. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973;52:2745–56. doi:10.1172/JCI107470.
66. Schmitz S. Der Experimentator: Zellkultur. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
67. Moreira R, Velz T, Alves N, Gesche VN, Malischewski A, Schmitz-Rode T, et al. Tissue-Engineered Heart Valve with a Tubular Leaflet Design for Minimally Invasive Transcatheter Implantation. *Tissue Eng Part C Methods* 2014. doi:10.1089/ten.TEC.2014.0214.
68. Mülhardt C. Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. 7th ed. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2013.

69. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4:357–62.
70. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research.* 1996;6:986–94. doi:10.1101/gr.6.10.986.
71. Turabelidze A, Guo S, DiPietro LA. Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair Regen.* 2010;18:460–6. doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00611.x.
72. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual. 2010. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>. Accessed 16 May 2018.
73. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101–8.
74. RT2 Profiler PCR Arrays. <https://www.qiagen.com/gb/shop/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays/?catno=PAHS-213Z#geneglobe>. Accessed 16 May 2018.
75. Valmikinathan CM, Hoffman J, Yu X. Impact of Scaffold Micro and Macro Architecture on Schwann Cell Proliferation under Dynamic Conditions in a Rotating Wall Vessel Bioreactor. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2011;31:22–9. doi:10.1016/j.msec.2010.04.001.
76. Ghasemi-Mobarakeh L, Morshed M, Karbalaie K, Fesharaki M-A, Nematollahi M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. The thickness of electrospun poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds influences cell proliferation. *Int J Artif Organs.* 2009;32:150–8.
77. Del Gaudio C, Bianco A, Grigioni M. Electrospun bioresorbable trileaflet heart valve prosthesis for tissue engineering: in vitro functional assessment of a pulmonary cardiac valve design. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2008;44:178–86.
78. Lam TV. Lam, T.V. (2005). The Mechanical Properties of Native Porcine Aortic and Pulmonary Heart Valve Leaflets. Master's Thesis, University of Pittsburgh. 2005.
79. Zioupos P, Barbenel JC. Mechanics of native bovine pericardium. I. The multiangular behaviour of strength and stiffness of the tissue. *Biomaterials.* 1994;15:366–73.
80. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, et al. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation.* 2000;102:III44-9.
81. Engelmayer GC, Rabkin E, Sutherland, Fraser W H, Schoen FJ, Mayer JE, Sacks MS. The independent role of cyclic flexure in the early in vitro development of an engineered heart valve tissue. *Biomaterials.* 2005;26:175–87. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.035.
82. Weston MW, Yoganathan AP. Biosynthetic activity in heart valve leaflets in response to in vitro flow environments. *Ann Biomed Eng.* 2001;29:752–63.

83. Del Gaudio C, Gasbarroni PL, Romano GP. Experimental investigations on the fluid-mechanics of an electrospun heart valve by means of particle image velocimetry. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;64:229–39. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.07.030.
84. Jabbari E, Khademhosseini A. Biologically-responsive hybrid biomaterials: A reference for material scientists and bioengineers. New Jersey: World Scientific; 2010.
85. Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, Shinoka T, Lien J, Moses MA, et al. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Ann. Thorac. Surg*. 1999;68:2298–304. doi:10.1016/S0003-4975(99)01055-3.
86. Sohier J, Carubelli I, Sarathchandra P, Latif N, Chester AH, Yacoub MH. The potential of anisotropic matrices as substrate for heart valve engineering. *Biomaterials*. 2014;35:1833–44. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.10.061.
87. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, et al. Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2001;19:424–30.
88. Belkin AM, Stepp MA. Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech*. 2000;51:280–301. doi:10.1002/1097-0029(20001101)51:3<280::AID-JEMT7>3.0.CO;2-O.
89. Zhou J, Shu Y, Lü S-H, Li J-J, Sun H-Y, Tang R-Y, et al. The spatiotemporal development of intercalated disk in three-dimensional engineered heart tissues based on collagen/matrigel matrix. *PLoS ONE*. 2013;8:e81420. doi:10.1371/journal.pone.0081420.
90. Eppihimer MJ, Sushkova N, Grimsby JL, Efimova N, Kai W, Larson S, et al. Impact of stent surface on thrombogenicity and vascular healing: a comparative analysis of metallic and polymeric surfaces. *Circ Cardiovasc Interv*. 2013;6:370–7. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.113.000120.
91. Wallace CS, Champion JC, Truskey GA. Adhesion and function of human endothelial cells co-cultured on smooth muscle cells. *Ann Biomed Eng*. 2007;35:375–86. doi:10.1007/s10439-006-9230-5.
92. Flanagan TC, Black A, O'Brien M, Smith TJ, Pandit AS. Reference models for mitral valve tissue engineering based on valve cell phenotype and extracellular matrix analysis. *Cells Tissues Organs (Print)*. 2006;183:12–23. doi:10.1159/000094902.
93. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am. J. Pathol*. 2007;171:1407–18. doi:10.2353/ajpath.2007.070251.
94. Ahmed F, Choudhury NR, Dutta NK, Zannettino A, Knott R. Near superhydrophobic fibrous scaffold for endothelialization: fabrication, characterization and cellular activities. *Biomacromolecules*. 2013;14:3850–60. doi:10.1021/bm400938n.

95. Rüder C, Sauter T, Becker T, Kratz K, Hiebl B, Jung F, et al. Viability, proliferation and adhesion of smooth muscle cells and human umbilical vein endothelial cells on electrospun polymer scaffolds. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012;50:101–12. doi:10.3233/CH-2011-1447.
96. Ponce ML, Nomizu M, Delgado MC, Kuratomi Y, Hoffman MP, Powell S, et al. Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain. *Circ. Res.* 1999;84:688–94.
97. Williams SK, Kleinert LB, Patula-Steinbrenner V. Accelerated neovascularization and endothelialization of vascular grafts promoted by covalently bound laminin type 1. *J Biomed Mater Res A.* 2011;99:67–73. doi:10.1002/jbm.a.33138.
98. Santiago LY, Nowak RW, Peter Rubin J, Marra KG. Peptide-surface modification of poly(caprolactone) with laminin-derived sequences for adipose-derived stem cell applications. *Biomaterials.* 2006;27:2962–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.011.
99. Lassance L, Miedl H, Konya V, Heinemann A, Ebner B, Hackl H, et al. Differential response of arterial and venous endothelial cells to extracellular matrix is modulated by oxygen. *Histochem Cell Biol* 2012. doi:10.1007/s00418-012-0917-4.
100. Xu H, Deshmukh R, Timmons R, Nguyen KT. Enhanced endothelialization on surface modified poly(L-lactic acid) substrates. *Tissue Eng Part A.* 2011;17:865–76. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0129.
101. Gardner H. Integrin  $\alpha 1\beta 1$ . *Adv Exp Med Biol.* 2014;819:21–39. doi:10.1007/978-94-017-9153-3\_2.
102. Gray KA, Yates B, Seal RL, Wright MW, Bruford EA. Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D1079-85. doi:10.1093/nar/gku1071.
103. Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adh Migr.* 2013;7:101–10. doi:10.4161/cam.22680.
104. Katagiri F, Ishikawa M, Yamada Y, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M. Screening of integrin-binding peptides from the laminin  $\alpha 4$  and  $\alpha 5$  chain G domain peptide library. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012;521:32–42. doi:10.1016/j.abb.2012.02.017.
105. Peters NS, Severs NJ, Rothery SM, Lincoln C, Yacoub MH, Green CR. Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium. *Circulation.* 1994;90:713–25.
106. Linask KK, Knudsen KA, Gui YH. N-cadherin-catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development. *Dev Biol.* 1997;185:148–64. doi:10.1006/dbio.1997.8570.
107. Stamm C, Khosravi A, Grabow N, Schmohl K, Treckmann N, Drechsel A, et al. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering. *Ann. Thorac. Surg.* 2004;78:2084-92; discussion 2092-3. doi:10.1016/j.athoracsur.2004.03.106.

108. Brown JW, Elkins RC, Clarke DR, Tweddell JS, Huddleston CB, Doty JR, et al. Performance of the CryoValve SG human decellularized pulmonary valve in 342 patients relative to the conventional CryoValve at a mean follow-up of four years. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2010;139:339–48. doi:10.1016/j.jtcvs.2009.04.065.
109. Konuma T, Devaney EJ, Bove EL, Gelehrter S, Hirsch JC, Tavakkol Z, Ohye RG. Performance of CryoValve SG decellularized pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann. Thorac. Surg.* 2009;88:849-54; discussion 554-5. doi:10.1016/j.athoracsur.2009.06.003.
110. Rieder E, Kasimir M-T, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, Weigel G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004;127:399–405. doi:10.1016/j.jtcvs.2003.06.017.
111. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;23:1002-6; discussion 1006.
112. Sarikouch S, Horke A, Tudorache I, Beerbaum P, Westhoff-Bleck M, Boethig D, et al. Decellularized fresh homografts for pulmonary valve replacement: a decade of clinical experience. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016;50:281–90. doi:10.1093/ejcts/ezw050.
113. Tudorache I, Horke A, Cebotari S, Sarikouch S, Boethig D, Breymann T, et al. Decellularized aortic homografts for aortic valve and aorta ascendens replacement. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016;50:89–97. doi:10.1093/ejcts/ezw013.
114. Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation.* 2006;114:1132-7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001065.
115. Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, Dekan B, Wolner E, et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J. Heart Valve Dis.* 2006;15:278-86; discussion 286.
116. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, et al. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation.* 2006;114:1559-65. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001206.
117. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Pruss A, Konertz W. Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. *Ann. Thorac. Surg.* 2011;92:1308–14. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.06.009.
118. Zhang X, Xu B, Puperi DS, Wu Y, West JL, Grande-Allen KJ. Application of hydrogels in heart valve tissue engineering. *J Long Term Eff Med Implants.* 2015;25:105–34.

- 119.Dijkman PE, Driessen-Mol A, Frese L, Hoerstrup SP, Baaijens, Frank P T. Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. *Biomaterials*. 2012;33:4545–54. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.015.
- 120.Serbo JV, Gerecht S. Vascular tissue engineering: biodegradable scaffold platforms to promote angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:1–8. doi:10.1186/scrt156.
- 121.Hinderer S, Shena N, Ringuette L-J, Hansmann J, Reinhardt DP, Brucker SY, et al. In vitro elastogenesis: instructing human vascular smooth muscle cells to generate an elastic fiber-containing extracellular matrix scaffold. *Biomed Mater*. 2015;10:34102. doi:10.1088/1748-6041/10/3/034102.
- 122.Schmidt D, Dijkman PE, Driessen-Mol A, Stenger R, Mariani C, Puolakka A, et al. Minimally-invasive implantation of living tissue engineered heart valves: a comprehensive approach from autologous vascular cells to stem cells. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2010;56:510–20. doi:10.1016/j.jacc.2010.04.024.
- 123.Kluin J, Talacua H, Smits AIPM, Emmert MY, Brugmans MCP, Fioretta ES, et al. In situ heart valve tissue engineering using a bioresorbable elastomeric implant - From material design to 12 months follow-up in sheep. *Biomaterials*. 2017;125:101–17. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.02.007.
- 124.Sugiura T, Matsumura G, Miyamoto S, Miyachi H, Breuer CK, Shinoka T. Tissue-engineered Vascular Grafts in Children With Congenital Heart Disease: Intermediate Term Follow-up. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2018. doi:10.1053/j.semtcvs.2018.02.002.
- 125.Malischewski A, Moreira R, Hurtado L, Gesché V, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S, Mela P. Umbilical cord as human cell source for mitral valve tissue engineering - venous vs. arterial cells. *Biomed Tech (Berl)*. 2017;62:457–66. doi:10.1515/bmt-2016-0218.
- 126.Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Yamanami M, Matsui Y, Oie T, et al. In-body tissue-engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater*. 2015;103:1–11. doi:10.1002/jbm.b.33186.
- 127.Driessen-Mol A, Emmert MY, Dijkman PE, Frese L, Sanders B, Weber B, et al. Transcatheter implantation of homologous "off-the-shelf" tissue-engineered heart valves with self-repair capacity: long-term functionality and rapid in vivo remodeling in sheep. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2014;63:1320–9. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.082.
- 128.Emmert MY, Weber B, Wolint P, Behr L, Sammut S, Frauenfelder T, et al. Stem cell-based transcatheter aortic valve implantation: first experiences in a pre-clinical model. *JACC Cardiovasc Interv*. 2012;5:874–83. doi:10.1016/j.jcin.2012.04.010.

- 
129. Petersen S, Strohbach A, Busch R, Felix SB, Schmitz K-P, Sternberg K. Site-selective immobilization of anti-CD34 antibodies to poly(l-lactide) for endovascular implant surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2014;102:345–55. doi:10.1002/jbm.b.33012.
130. Butcher JT, Tressel S, Johnson T, Turner D, Sorescu G, Jo H, Nerem RM. Transcriptional profiles of valvular and vascular endothelial cells reveal phenotypic differences: influence of shear stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:69–77. doi:10.1161/01.ATV.0000196624.70507.0d.
131. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814>. Accessed 16 May 2018.
132. Applied Biosystems. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits For 200 and 1000 Reactions Protocol. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms\\_042557.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042557.pdf). Accessed 16 May 2018.

## 7. Anhang

### 7.1 Protokolle und Anleitungen

I. Zusammensetzung Nabelschnurpufferlösung (CB-):

(0,2mm gefiltert)

140 mM NaCl

4 mM KCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

11 mM glucose,

10 mM HEPES [pH 7.4]

II. Endothelzellmedium (EBM™-2 Basal Medium+ Zusätze = EGM™-2 Medium, Lonza Group AG (Basel, Switzerland):

FBS 2% (fetal bovine serum)

Hydrocortison (0.04% hydrocortisone)

hFGF-β (0.4% human fibroblast growth factor)

VEGF (0.1% (vascular) endothelial growth factor)

R3-IGF (insulin-like-growth-factor)

Ascorbic Acid (0.1% ascorbic acid)

hEGF (0.1% human epidermal growth factor)

GA-1000 (0.1% Gentamicin/Amphotericin-B)

Heparin (0.1% heparin)

III. Primäre immunhistochemische Antikörper der Firma Abcam:

Laminin-1+2 (ab7463, Rb pAb to Laminin1+2)

Integrin-β1 (ab52971, Rb mAb to Integrinβ1, EP1041Y)

Collagen-IV (ab6586, Rb pAb to CollagenIV)

Fibronectin (ab2413, Rb pAb to Fibronectin)

IV. Auszug aus dem Herstellerprotokoll des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*

[131] [132]



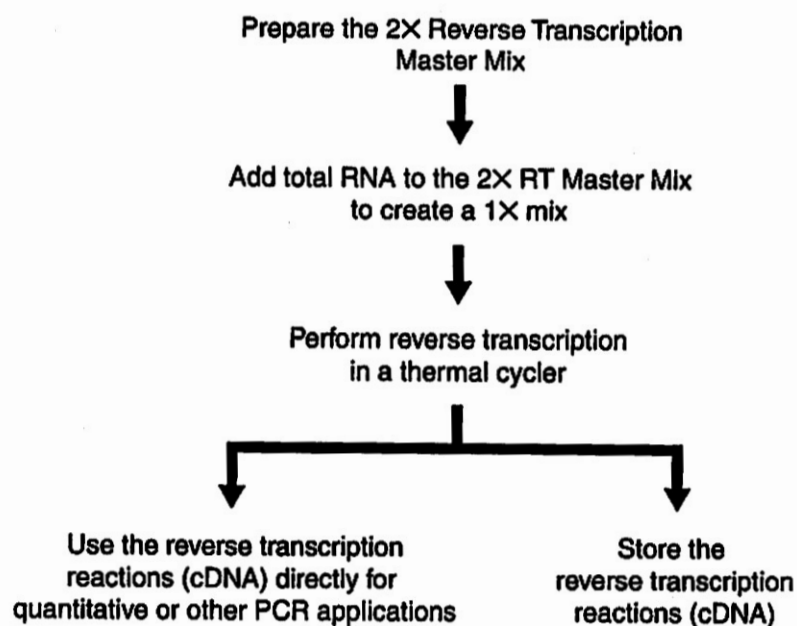
---

*Using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*

---

## Using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits

**Overview** To synthesize single-stranded cDNA from total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits:



### RNA Template Guidelines

For optimal performance of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems recommends using RNA that is:

- Free of inhibitors of reverse transcription and PCR
- Dissolved in PCR-compatible buffer or water
- Free of RNase activity

**Note:** If you suspect that the RNA contains RNase activity, add RNase Inhibitor to the reverse transcription reaction at a final concentration of 1.0 U/ $\mu$ L.

### Input Amount of Total RNA

Use up to 2  $\mu$ g of total RNA per 20- $\mu$ L reaction.

**Preparing the  
2X Reverse  
Transcription  
Master Mix**

Prepare the 2X RT master mix using the kit components before preparing the reaction plate.

To prepare the 2X RT master mix (per 20- $\mu$ L reaction):

1. Allow the kit components to thaw on ice.
2. Referring to the table below, calculate the volume of components needed to prepare the required number of reactions.

**Note:** Prepare the RT master mix on ice.

Component	Volume/Reaction ( $\mu$ L)	
	Kit with RNase Inhibitor	Kit without RNase Inhibitor
10X RT Buffer	2.0	2.0
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8	0.8
10X RT Random Primers	2.0	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0	1.0
RNase Inhibitor	1.0	—
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3.2	4.2
<b>Total per Reaction</b>	<b>10.0</b>	<b>10.0</b>

**IMPORTANT!** Include additional reactions in the calculations to provide excess volume for the loss that occurs during reagent transfers.



**WARNING CHEMICAL HAZARD.** 10X Reverse Transcription Buffer may cause eye, skin, and respiratory tract irritation. Read the MSDS, and follow the handling instructions. Wear appropriate eyewear, clothing, and gloves.

3. Place the 2X RT master mix on ice and mix gently.

*Using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*

### Preparing the cDNA Reverse Transcription Reactions

To prepare the cDNA RT reactions:

1.	Pipette 10 $\mu$ L of 2 $\times$ RT master mix into each well of a 96-well reaction plate or individual tube.
2.	Pipette 10 $\mu$ L of RNA sample into each well, pipetting up and down two times to mix.
3.	Seal the plates or tubes.
4.	Briefly centrifuge the plate or tubes to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.
5.	Place the plate or tubes on ice until you are ready to load the thermal cycler.

### Performing Reverse Transcription

To perform reverse transcription:

1.	Program the thermal cycler conditions using one of the thermal cyclers listed in Table 3 on page 4.				
	<b>IMPORTANT!</b> These conditions are optimized for use with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits.				
		Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
	Temperature (°C)	25	37	85	4
	Time	10 min	120 min	5 min	∞

2.	Set the reaction volume to 20 μL.
3.	Load the reactions into the thermal cycler.
4.	Start the reverse transcription run.

---

*Using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*

---

**Storing cDNA  
Reverse  
Transcription  
Reactions**

You can store cDNA RT plates or tubes prepared using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for short-term or long-term storage.

Storage Duration	Storage Temperature (°C)
Short-term (up to 24 hours before use)‡	2 to 6
Long-term	-15 to -25

‡ For prolonged storage at 2 to 6 °C, add EDTA to a final concentration of 1 mM to chelate cations and to prevent nucleic acid degradation.

**IMPORTANT!** If required, briefly centrifuge the archive plates or tubes before storing to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.

### V. Mastermix cDNA Umschreibung:

10x RTBuffer 2,0µl

25x dNTP Mix 0,8µl

10x RT Random primer 2,0µl

Multiscribe RT 1,0µl

RNAse Inh. 1,0µl

Nuclease free water 3,2µl bzw 4,2µl = 11µl auf 9µl RNA

### VI. Protokoll für das Rasterelektronenmikroskop:

#### 1. Fixierlösung für REM- Proben

- 40ml Natriumcacodylat (0,2M)
- 20ml PBS
- 20ml Glutaraldehyd 25%

#### 2. Entwässerung der Proben

- spülen mit Natriumphosphatpuffer
- kurz spülen in 30% Ethanol
- 10min in 50% Ethanol
- 10min in 75% Ethanol
- 15min in 90% Ethanol
- 2x 10min in 100% Ethanol

#### 3. Trocknen der Proben mit Kritisch- Punkt Trockner

- lt. Anleitung des Gerätes CPD 7501, Fa. Polaron

(Quelle: Universitätsmedizin Rostock, Institut für Biomedizinische Technik, Friedrich-Barnewitz-Str. 4,18119 Rostock)

### VII. VECTOR® HEMATOXYLIN QS NUCLEAR COUNTERSTAIN (Modified Mayer's Formula) Catalog Number H-3404 – Protokoll:

1. Histologische Schnitte in Leitungswasser waschen

2. Vector® Hematoxylin QS counterstain auf die Objekte geben, Gewebe dabei komplett bedecken

3. Mit Vector® Hematoxylin QS für 5 Sekunden inkubieren

4. Schnitte mit Leitungswasser waschen

5. Dehydratation in Alkoholreihe und Eindeckung in Eindeckmedium

VIII. RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Cell Junction PathwayFinder (PAHS-213Z):

Gen-Liste [74]:

Focal Adhesions	CAV1, CAV2, CAV3, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4 (CD49D), ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGA9, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, ITGB6
Tight Junctions	CLDN1, CLDN10, CLDN11, CLDN12, CLDN14, CLDN15, CLDN16, CLDN17, CLDN18, CLDN19, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN5, CLDN6, CLDN7, CLDN8, CLDN9, ESAM, F11R, ICAM1, ICAM2, JAM2, JAM3, OCLN, TJP1, TJP2, TJP3
Gap Junctions	GJA1 (CX43), GJA3, GJA4, GJA5, GJA8, GJB1 (CX32), GJB2 (CX26), GJB3, GJB4, GJB5, GJB6, GJC2, GJD2, GJC3
Adherens Junctions	CDH1 (E-Cadherin), CDH2 (N-Cadherin), DLL1 (DELTA1), NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PVRL1, PVRL2, PVRL3
Desmosomen	DSC1, DSC2, DSC3, DSG1, DSG2, DSG3, DSG4, DSP, JUP (CTNNG)
Hemidesmosomen	DST, PLEC

### 7.2 Information und Einwilligung zur Nabelschnurspende



Referenz- und Translationszentrum  
für kardiale Stammzelltherapie  
Universität Rostock

## Information zur Nabelschnurspende

Sehr geehrte werdende Mutter,

Sie werden in Kürze an der Universitätsfrauenklinik Rostock entbinden – wir wünschen Ihnen und Ihrem Kind alles Gute!

Mit diesem Schreiben möchten wir Sie bitten, nach der Geburt die Nabelschnur Ihres Kindes für die medizinische Forschung zu spenden. Üblicherweise wird die Nabelschnur nach der Geburt abgebunden, getrennt und zusammen mit der Nachgeburt entsorgt.

Für die Wissenschaft ist die Nabelschnur jedoch sehr wertvoll, da wir aus ihr Zellen gewinnen können, deren Erforschung uns hilft, Stammzelltherapien für Herzkrankheiten weiter zu entwickeln.

Auf den Ablauf Ihrer Entbindung hat die Nabelschnurspende keinen Einfluss. Wenn Sie sich für eine Spende entscheiden, würde die Nabelschnur nach der Geburt anonym der Forschung zur Verfügung gestellt, das heißt, wir werden keinerlei personenbezogenen Daten sammeln oder speichern. Ihre Zustimmung zur Nabelschnurspende für die Forschung ist freiwillig und kann jederzeit bis zum Zeitpunkt der Entbindung widerrufen werden, ohne dass Ihnen hieraus irgendwelche Nachteile erwachsen.

### Unsere Forschungsprojekte, denen Ihre Spende zugute kommt:

Wir werden Zellen aus Blutgefäßen der Nabelschnur isolieren. Diese sogenannten Endothelzellen kleiden jede Ader von innen aus und können zur Bildung neuer Blutgefäße beitragen. Dieser Prozess kann ungenügend durchblutetes Gewebe (beispielsweise nach einem Herzinfarkt) regenerieren. Die Neubildung von Blutgefäßen wird außerdem durch Stammzellen gefördert. Wir untersuchen an der Klinik für Herzchirurgie der Universität Rostock nun, wie durch Endothelzellen und Stammzellen neue Blutgefäße gebildet werden, um die Therapie verschiedener Herzerkrankungen zukünftig zu verbessern.

Bei einigen Patienten unserer Klinik sind die Herzklappen so stark geschädigt, dass sie ersetzt werden müssen. Die dabei heutzutage verwendeten Herzklappen werden jedoch häufig vom Immunsystem des Körpers als fremdartig erkannt und die Patienten erkranken nach gewisser Zeit erneut. Durch eine Besiedlung dieser Herzklappen mit menschlichen Endothelzellen und Stammzellen wollen wir erreichen, dass die Klappen von den Patienten dauerhaft gut getragen werden. In unserem Labor testen wir dazu verschiedene Besiedlungsverfahren, um Haltbarkeit und Funktion einer ersetzten Herzklappe deutlich verbessern können. Erst wenn das optimale Besiedlungsverfahren gefunden und umfassend auf Risiken geprüft wurde, können die Klappen an Patienten eingesetzt werden; dies wird mit Zellen aus der von Ihnen gespendeten Nabelschnur nicht durchgeführt.

**Wir bedanken uns für Ihre Unterstützung unserer Forschungsvorhaben durch eine Nabelschnurspende.**

Falls Sie weitere Fragen zu unseren Forschungsprojekten haben, können Sie sich gern an uns wenden:

**Dr. Cornelia Lux**

Projektleiterin, Pharmazeutin  
Referenz- und Translationszentrum  
für kardiale Stammzelltherapie (RTC)  
Schillingallee 68  
D-18057 Rostock  
Telefon: 0381 - 494 39 04  
Fax: 0381 - 494 61 02  
cornelia.lux@med.uni-rostock.de

**Dr.med. Christian Klopsch**

Studienleiter, Assistenzarzt, Prüfarzt  
Klinik für Herzchirurgie, Universität Rostock,  
Schillingallee 35  
D-18057 Rostock  
Telefon: 0381 - 494 61 01  
Fax: 0381 - 494 61 02  
klopschc@med.uni-rostock.de



Name der Entbindenden   Ort, Datum   Unterschrift (Entbindende)

Name des Arztes	Ort, Datum Unterschrift (Arzt)
-----------------	--------------------------------



Referenz- und Translationszentrum  
für kardiale Stammzelltherapie  
Universität Rostock

### Einwilligung zur Spende der Nabelschnur für wissenschaftliche Zwecke

Ich, ....., wurde vom unten genannten Arzt vollständig über die Nabelschnurspende für wissenschaftliche Zwecke aufgeklärt. Ich habe den Text zur Aufklärung gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit Fragen zu stellen, habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Mein Arzt hat mich über die Tragweite meiner Zustimmung informiert. Ich hatte ausreichend Zeit, mich für die Nabelschnurspende zu Forschungszwecken bereit zu erklären und weiß, dass ich diese Zustimmung jederzeit bis zum Zeitpunkt der Entbindung widerrufen kann, ohne dass daraus für mich Nachteile erwachsen. Ich erkläre auch mein Einverständnis zur wissenschaftlichen Veröffentlichung von Forschungsergebnissen, die unter Verwendung von Zellen aus der von mir gespendeten Nabelschnur erzielt wurden. Ich habe eine Kopie der Information zur Nabelschnurspende für Entbindende und dieser Einwilligungserklärung erhalten und erkläre hiermit meine freiwillige Zustimmung zur Nabelschnurspende.

.....  
Name der Spenderin

.....  
Ort, Datum Unterschrift (Spenderin)

Ich erkläre hiermit, dass ich die Entbindende ausführlich über die Nabelschnurspende aufgeklärt habe und die Nabelschnur nur für Forschungszwecke verwendet wird, wenn die Entbindende auf dem Einwilligungsbogen ihre Zustimmung durch Unterschrift erteilt.

.....  
Name des Arztes

.....  
Ort, Datum Unterschrift (Arzt)

## Publikation

Klopsch C, Ludwig M, Skorska A, **Zacher L**, Jerke M, Luderer F, Arbeiter D, Grabow N, Michael T, Gaebel R, Lux C, Mela P, Jockenhoevel S, Prall F, David R, Steinhoff G. Direct sprayed endothelialization, basement membrane and cell junction development on biological and artificial products are highly substrate-dependent and require optimized biofunctionalization. *BioNanoMaterials*. 2015;16(1):285-99. DOI:10.1515/bnm-2015-0010 (De Gruyter database; ISSN 2193-066X)

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name	<b>Zacher</b>
Vorname	<b>Loni</b>
Anschrift	Campestraße 33 38302 Wolfenbüttel mobil: +49 (0)176 62906336 Email: loni.zacher@gmail.com
Geburtsdatum	01.11.1989
Geburtsort	Braunschweig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

### Berufserfahrung

seit 03/2017	Ärztin in Weiterbildung im Fach Dermatologie (Gemeinschaftspraxis, Braunschweig)
--------------	---

### Bildung

seit 08/2016	Ärztliche Approbation
06/2016	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Staatsexamen, Note gut)
05/2015 - 05/2016	Studentin im Praktischen Jahr (Innere Medizin, Chirurgie, Dermatologie)
10/2014	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
07/2013	Teilnahme an der 9ten Internationalen <i>Summer School</i> für Tropenmedizin (University of Muhammadiyah Yogyakarta, Indonesien)
seit 08/2012	Medizinische Doktorandin in der Herzchirurgie der Universitätsmedizin Rostock
2011 - 2016	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
2009 - 2011	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg (Abschluss: Erster Abschnitt der ärztlichen

	Prüfung)
09/2009	Medizinstudium an der Université du Luxembourg
04/2009 - 07/2009	Vorsemesterkurs Medizin (Rheinisches Bildungszentrum Köln)
2008	Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Praktika

05/2015 - 05/2016	Praktisches Jahr (Südstadt Klinikum Rostock, Universitätsmedizin Rostock, Klinikum Bad Doberan)
02/2014 - 03/2014	Famulatur Klinik für Herzchirurgie (Universitätsmedizin Rostock)
08/2013	Famulatur Klinik für Kinderchirurgie (Universitätsmedizin Rostock)
02/2013	Famulatur American Hospital, Anästhesiologie (Istanbul)
09/2012	Famulatur Dermatologie, Allergologie und Phlebologie (Braunschweig)
07/2012	Famulatur Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (Universitätsmedizin Rostock)
02/2012 - 03/2012	Famulatur Klinik für Innere Medizin, Hämatologie und Onkologie, (Universitätsmedizin Rostock)
09/2008 - 03/2009	Krankenpflegepraktikum im Rahmen des Freiwilligen Sozialen Jahres, interdisziplinäre Station (Schlossparkklinik, Berlin)
12/2005	Praktikum in der Kinder und Jugendklinik (Städtisches Klinikum Braunschweig)

### Ehrenamt

2015 - 2016	Mitarbeit im Rostocker Studentenmagazin „Heuler“
2009 - 2011	Mitarbeit bei der Organisation der Teddyklinik Marburg
seit 2001	Mitglied im Verband Christlicher Pfadfinderinnen und Pfadfinder

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei Prof. Dr. Steinhoff für die Bereitstellung dieses spannenden Themas sowie für die Ermöglichung der experimentellen Umsetzung im Labor der Herzchirurgie Rostock.

Dr. Christian Klopsch möchte ich für die langjährige Betreuung, die Ideenentwicklung, die geduldige Hilfestellung im Labor über Stunden, die ständige Erreichbarkeit und das immer bestehende Verständnis danken. Es hat mir Freude gemacht, mit einem jungen und motivierten Arzt das Konzept umzusetzen.

Ein großer Dank gilt dem ganzen Team des FKGOs. Vielen Dank an die guten Seelen des Labors Margit Fritsche und Madeleine Bartsch ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Außerdem danke ich Dr. Anna Skorska für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Anita Tölk für die Durchführung des PCR-Arrays sowie weitere Hilfestellungen. Karina Müller-Brown möchte ich dafür danken, dass sie mir geduldig die PCR beibrachte und Nivi Obla für ihre Hilfsarbeiten. Danke an Thomas Michael für die gute Zusammenarbeit und die ideengebenden Diskussionen. Dr. Ralf Gäbel und Dr. Cornelia Lux danke ich für das Vor-Ort-sein bei jeglichen biologischen oder labortechnischen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Prall aus der Pathologie, der bei der Beurteilung der Basalmembranentwicklung seine Fachkenntnisse lieferte.

Aus dem Institut für Biomedizinische Technik danke ich Prof. Dr. Sternberg, Prof. Dr. Grabow und Prof. Dr. Schmitz für die Ermöglichung der Partnerschaft sowie besonders Dr. Frank Luderer und Daniela Arbeiter für die Materialien und Grafiken, die Zusammenarbeit und das Teilen des Fachwissens.

Außerdem gilt mein Dank den spendenden Müttern sowie dem netten Team des Kreißsaals der Universitätsfrauenklinik Rostock.

Ein ganz persönlicher Dank soll an meine große und meine kleine Familie gehen. Ich danke meinen wunderbaren Eltern für die Unterstützung im Studium und das mitgegebene Interesse an Medizin und Biologie. Nur durch Vorbilder wie meine Eltern und Geschwister war es mir möglich, diese Arbeit zu vollenden. Ich danke Florian für die Unterstützung und Geduld während der vielen Jahre und das liebevolle Zusammenleben an jedem neuen Tag. Ich danke meinen beiden Kleinen für die Begleitung aus dem Bauch heraus während des Schreibens und für die ständige Erinnerung an die wichtigen Aspekte des Lebens.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere eidesstattlich, dass die eingereichte Dissertation selbständig auf der Grundlage der angegebenen Hilfen von mir angefertigt worden ist und ohne fremde Hilfe, bis auf jene der genannten Personen, verfasst und andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet worden sind. Die in den verwendeten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde bisher weder vorher noch gleichzeitig in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Wolfenbüttel, den 23.03.2019

Loni Zacher